Disclaimer

Für die Vollständigkeit und Richtigkeit der einzelnen Inhalte der „Entwicklungsbiologie für BScBiol/BScMLS/BA“ kann keine Gewähr übernommen werden. Es ist nicht gestattet, diese Vorlesung oder Teile derselben ohne ausdrückliche Genehmigung der Dozentinnen und Dozenten für die Wiedergabe im Druck, Vorträge oder eine andere Art der Veröffentlichung, auch nicht im Internet, zu verwenden. Für Teile der Abbildungen liegen die Rechte bei Buchverlagen, wissenschaftlichen Zeitschriften oder bei den Dozentinnen und Dozenten dieser Veranstaltung.

Arp Schnittger

Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Universität Hamburg
Bachelorstudiengang Biologie

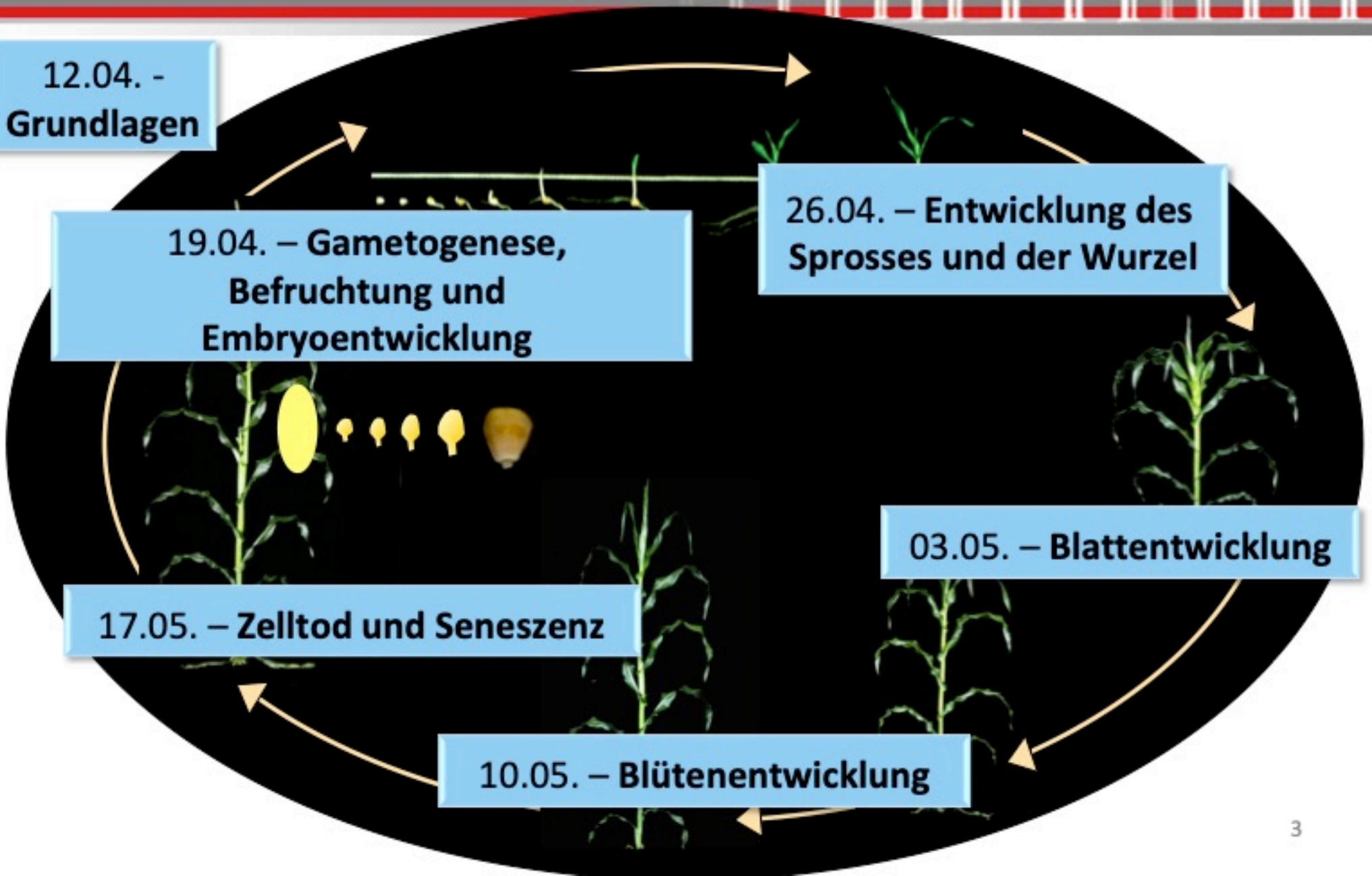
Entwicklungsbiologie

Sommersemester 2021

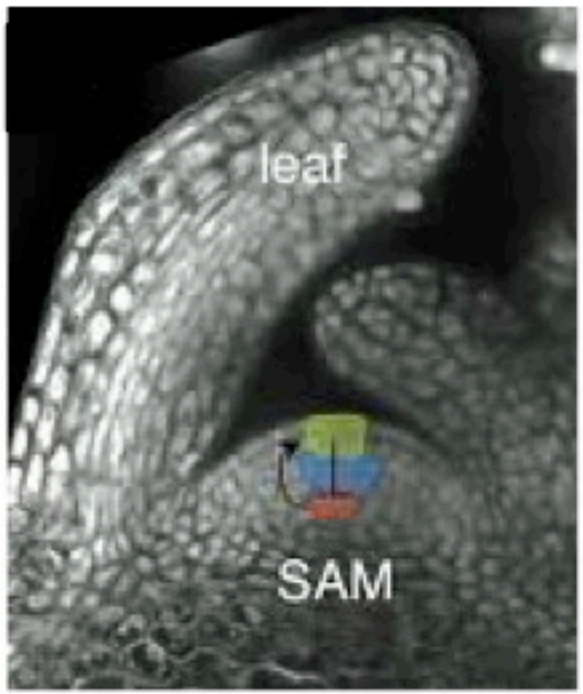
Arp Schnittger
Biozentrum Klein Flottbek

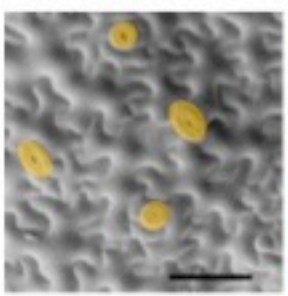
arp.schnittger@uni-hamburg.de

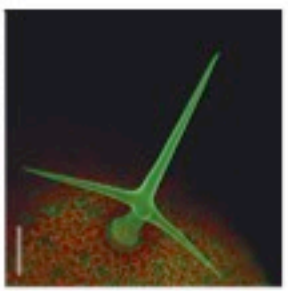
Vorlesung Entwicklungsbiologie SoSe 2021


12.04. - Grundlagen
19.04. – Gametogenese, Befruchtung und Embryoentwicklung
26.04. – Entwicklung des Sprosses und der Wurzel
03.05. – Blattentwicklung
10.05. – Blütenentwicklung
17.05. – Zelltod und Seneszenz

Konzepte der Vorlesung Blattentwicklung







- **Wie entsteht eine Blattanlage?**
- **Wie entstehen zusammengesetzte Blätter?**
- **Wie entsteht Blatt-Polatiät?**
- **Blattwachstum und Form**
  - Mais
  - Arabidopsis
- **Differenzierungsprozesse**
  - Trichome
  - Stomata

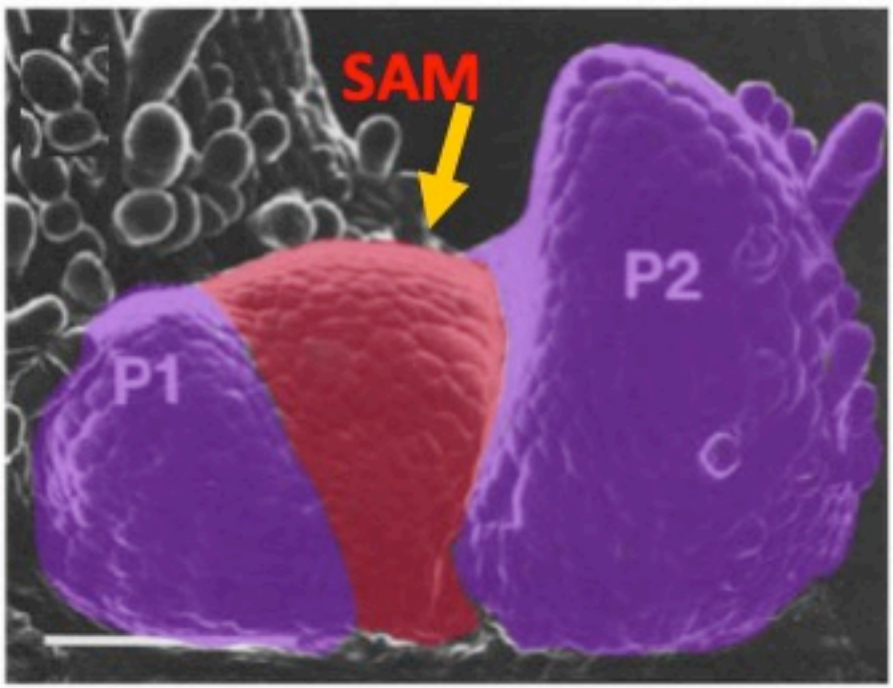
Methodik in dieser Vorlesung

Micro surgery

Zwei sehr nützliche Reporterlinien:

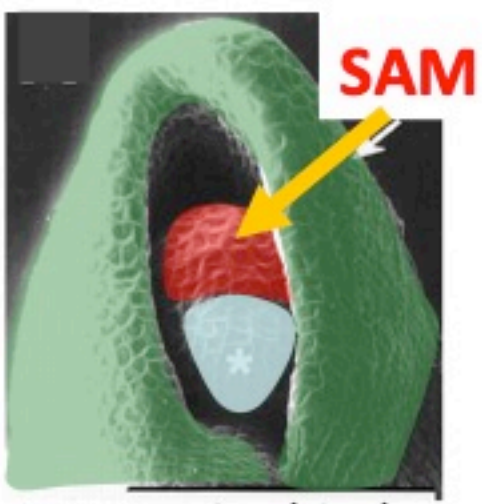
- **CYCB1-DB**
- **DR5**

Blätter entstehen am Sprossapikalmeristem (SAM)

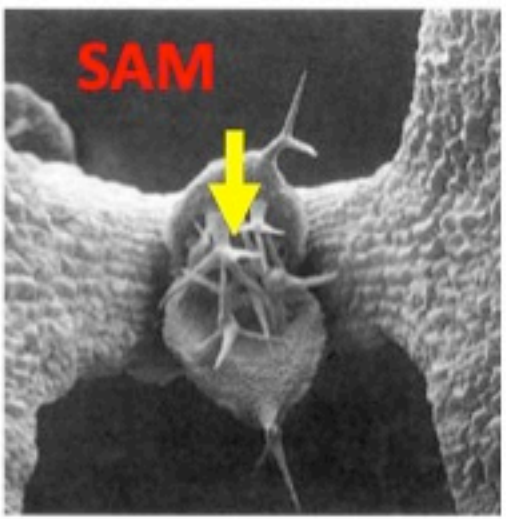


Nicotiana tabacum (tobacco)

Die kleinen Blättchen um das Meristem heißen **Primordien**



Oryza sativa (rice)

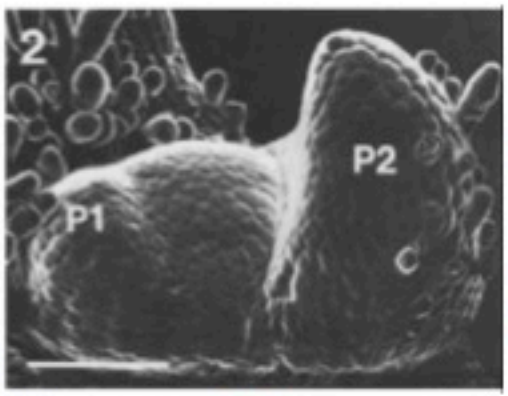


Arabidopsis thaliana

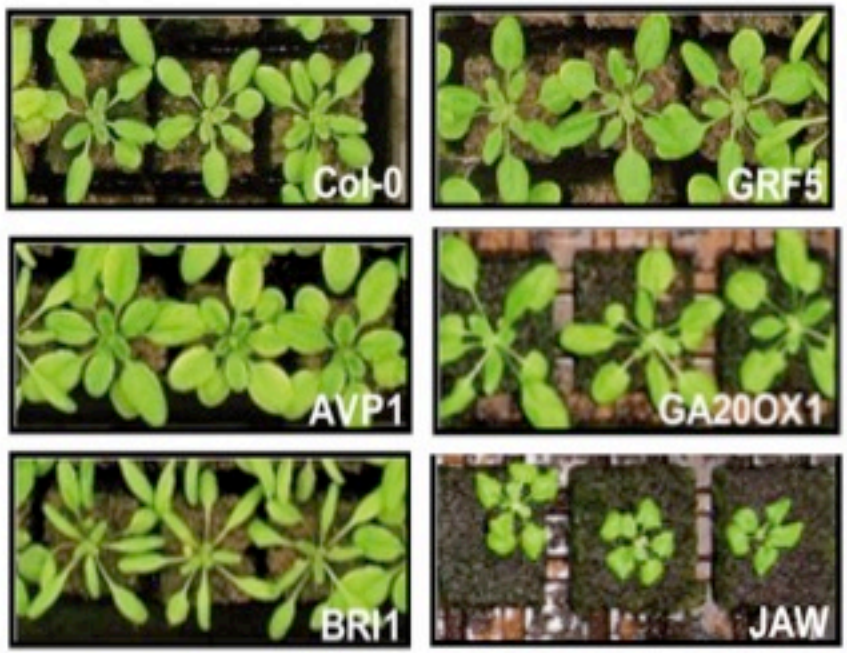
Der Durchmesser des Meristems beträgt in der Regel 0.1 – 1 mm.

Poethig , R.S. and Sussex ,I.M. (dynamics of the tobacco leaf. Planta 165: 158-169. Copyright (1985) Planta. Itoh, J.-I., Kitano, H., Matsuoka M., and Nagato, Y. (2000) *SHOOT ORGANIZATION* genes regulate shoot apical meristem organization and the pattern of leaf rrimordium initiation in rice. Plant Cell 12:2161-2174; Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K. (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. Nature 379: 66-69.

Formenvielfalt bei Blättern



Anwendung des Wissens über Blattwachstum

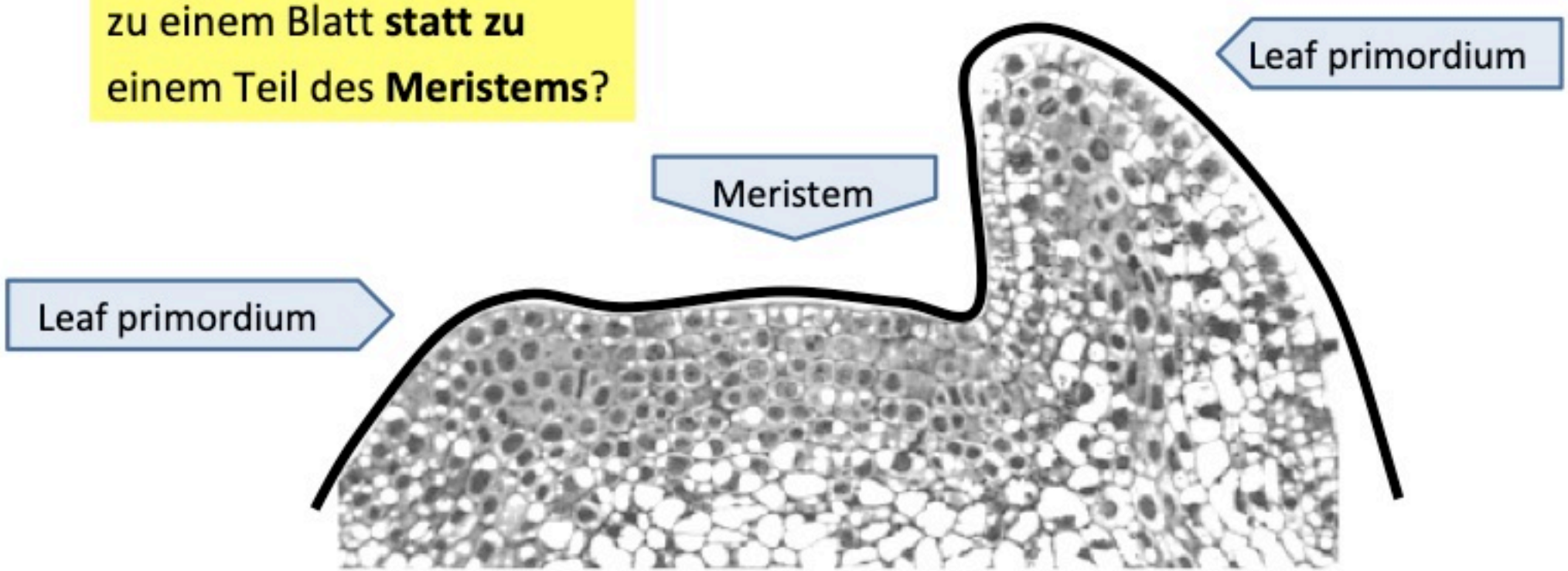


Viele Gene wurden bereits identifiziert, die das Wachstum und die Form von Blättern steuern. Daraus ergibt sich ein grosses Anwendungspotential, um die Biomasse zu steigern.

Gonzalez, N., De Bodt, S., Sulpice, R., Jikumaru, Y., Chae, E., Dhondt, S., Van Daele, T., De Milde, L., Weigel, D., Kamiya, Y., Stitt, M., Beemster, G.T.S. and Inzé, D. (2010). Increased leaf size: Different means to an end. Plant Physiol. 153: 1261-1279; Photo courtesy S. Long Lab, University of Illinois, 2006.

Genetische Kontrolle der Blattentwicklung

Wie wird das **Primordium** zu einem Blatt **statt zu** einem Teil des **Meristems**?

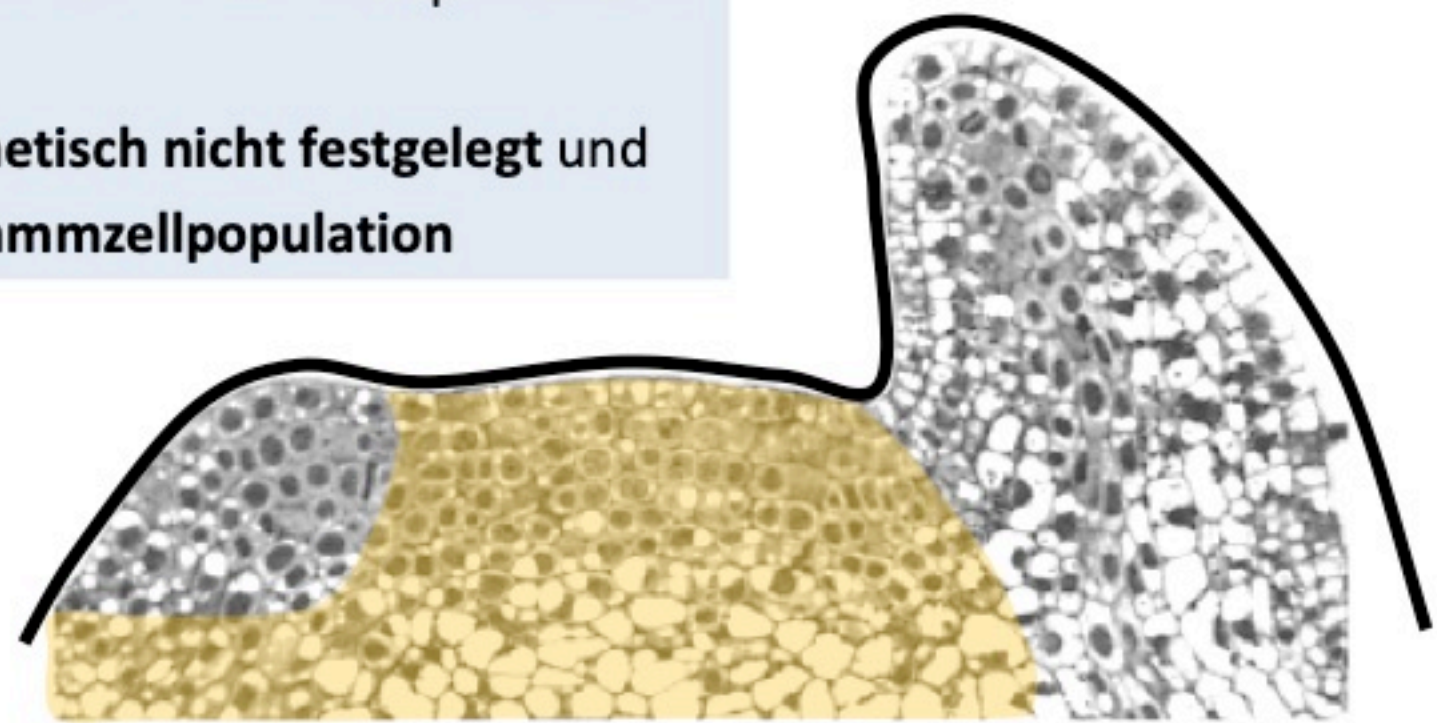


Poethig , R.S. and Sussex ,I.M. (1985) The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. Planta 165: 158-169.

Zellen im Meristem sind nicht determiniert

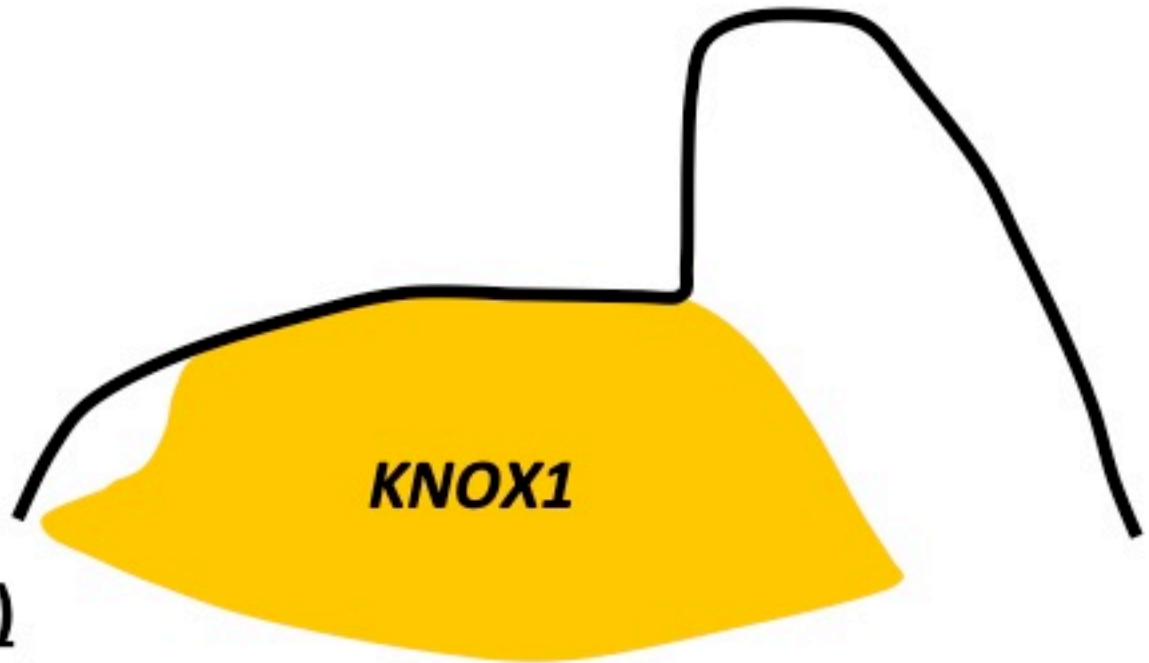
- Zellen im Meristem unterscheiden sich **funktionell** von denen der Blattprimordien

- Sie sind **genetisch nicht festgelegt** und dienen als **Stammzellpopulation**



Poethig , R.S. and Sussex ,I.M. (1985) The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. Planta 165: 158-169

KNOX1 Gene erhalten den meristematischen Zustand



<u>Klasse I *KNOX* Gene (*KNOX1*)</u>

- (*KNOX* = *Knotted*-like homeobox)
- Codieren **Transkriptionsfaktoren**
- **Exprimiert** im Meristem
- **Nicht exprimiert** in entwicklenden Primordien
- Helfen, ***undeterminiertes*** **Wachstum** zu erhalten

KNOTTED Genexpression

Methode: mRNA in situ Hybridisierung (➔ VL3)

***KNOTTED* 1** (ein *KNOX1*-Gen) mRNA akkumuliert im **Meristem**, aber nicht in den Blattprimordien (Pfeile) von *Zea mays*

Jackson, D., Veit, B., and Hake, S. (1994) Expression of maize KNOTTED1 related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. Development 120: 405–413.

Knotted1 Mutante Mais

dominant (neomorph),
da ***ektopische***
Expression von
Knotted1

http://www.maizegdb.org/cgi-bin/phenovarimages.cgi?id=51329

KNOX1 Gene kontrollieren die Undifferenziertheit des Meristems

Methode: Überexpression (➔VL3) von KNOX-Faktoren

Gain of function
in Blattprimordien

KNOX-OE

Arabidopsis

WT *KNOX*-OE
(overexpression)

Tabak

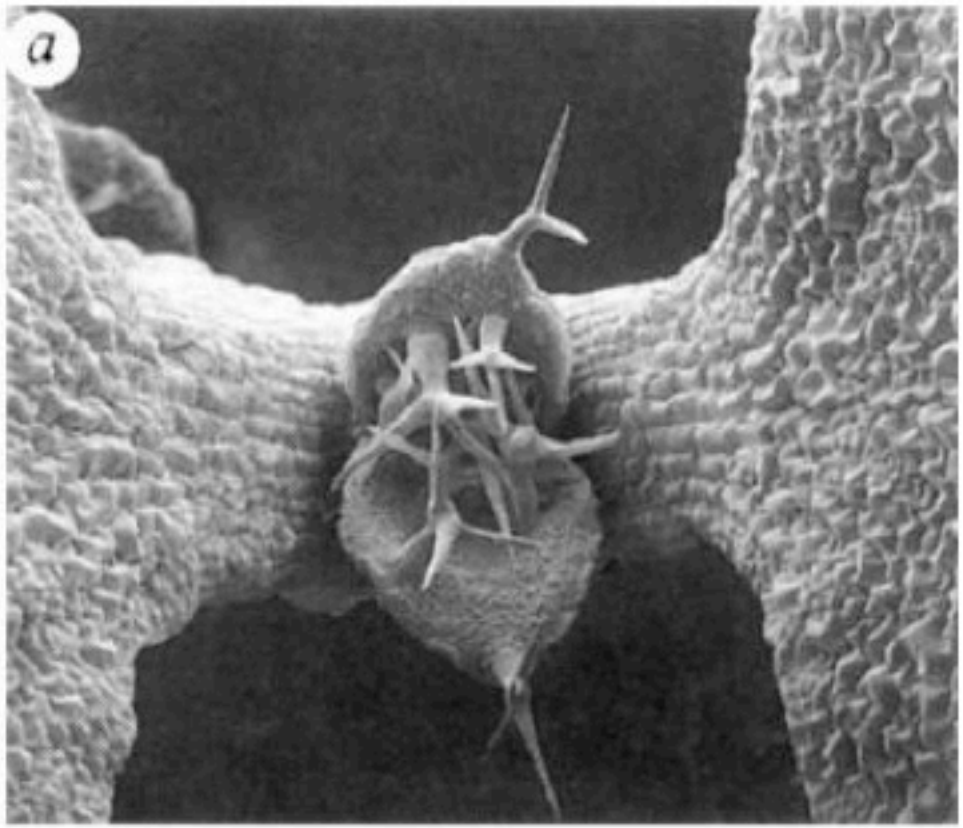
WT *KNOX*-OE

Mais

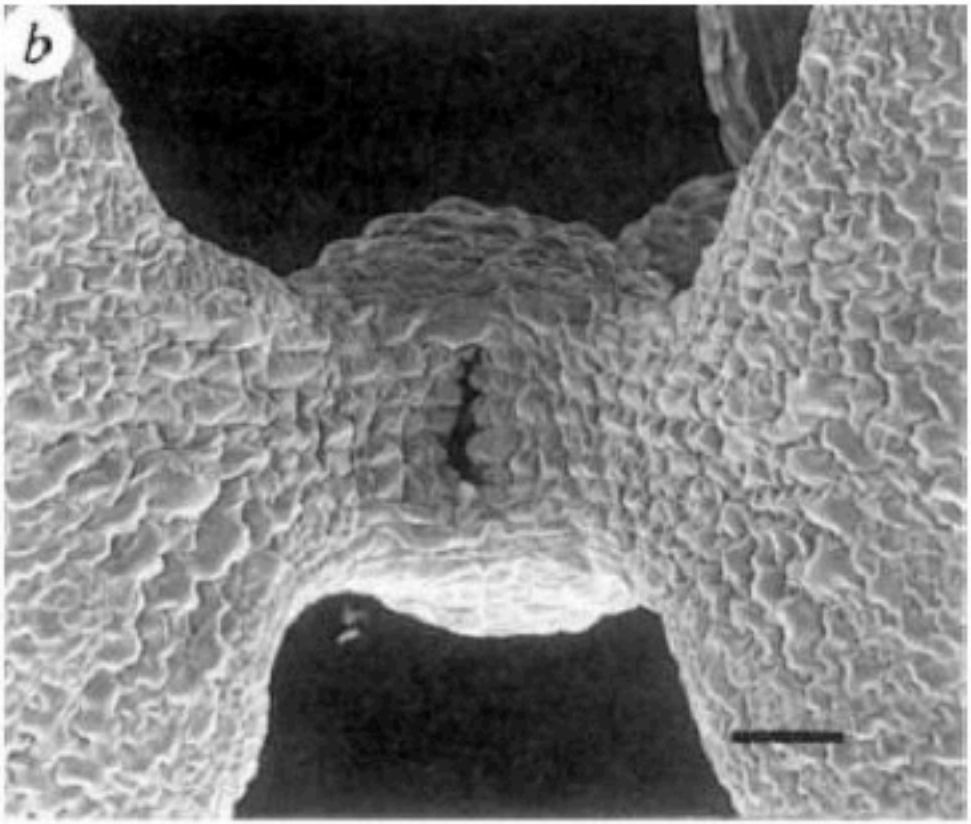
WT *KNOX*-OE

Chuck, G., Lincoln, C., and Hake, S. (1996) KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. Plant Cell 8: 1277-1289 ; Hake, S., and Ori, N. (2002) Plant morphogenesis and *KNOX* genes. Nat. Genet. 31: 121 – 122

STM, ein *KNOX1* Gen, ist essentiell für die Funktion des Sprossmeristems



Die Wildtyp-Pflanze bildet Blätter am Sprossapex.



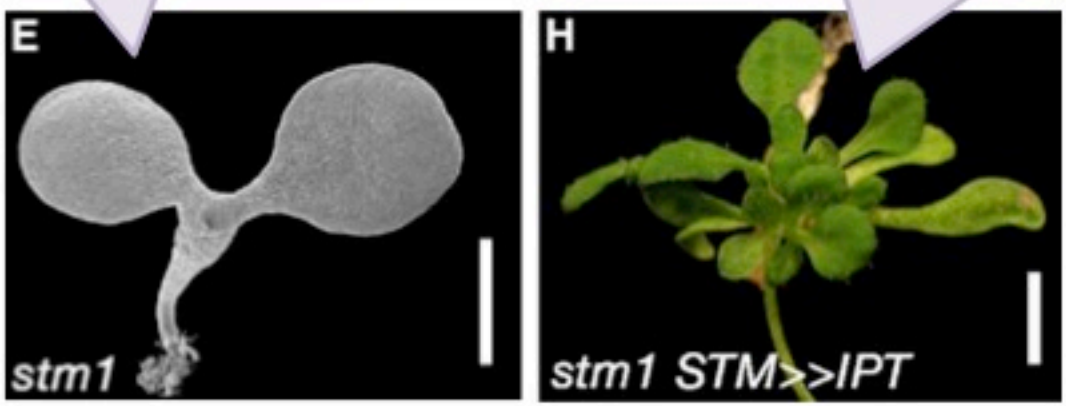
In der ***shootmeristemless*** Mutante (*stm*) wird während der Embryogenese kein SAM angelegt (➔VL3); entsprechend werden keine Blätter gebildet.

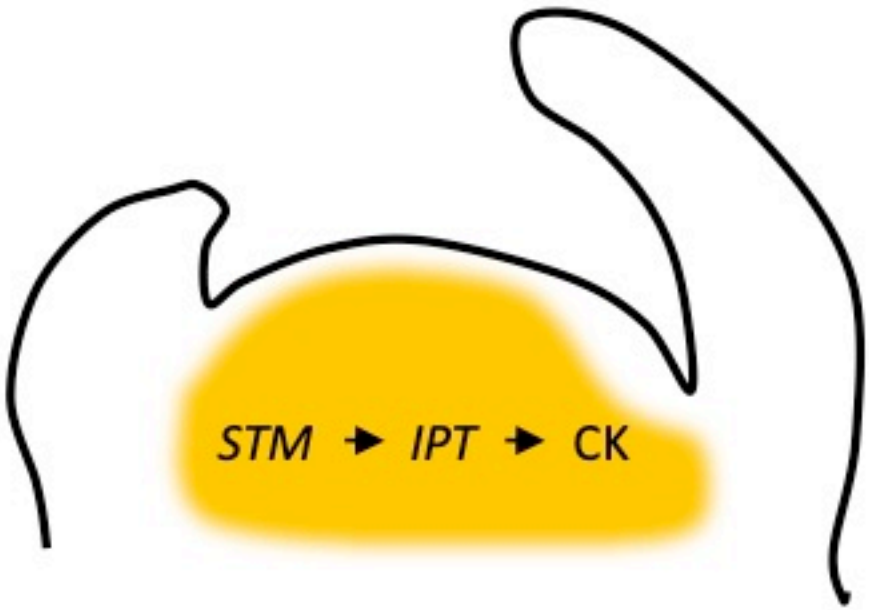
Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K. (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. Nature 379: 66-69.

KNOX1 Gene stimulieren die Cytokinin-Biosynthese

Arabidopsis stm Mutante

Expression von *IPT* durch den *STM*-Promotor in der *stm* Mutante





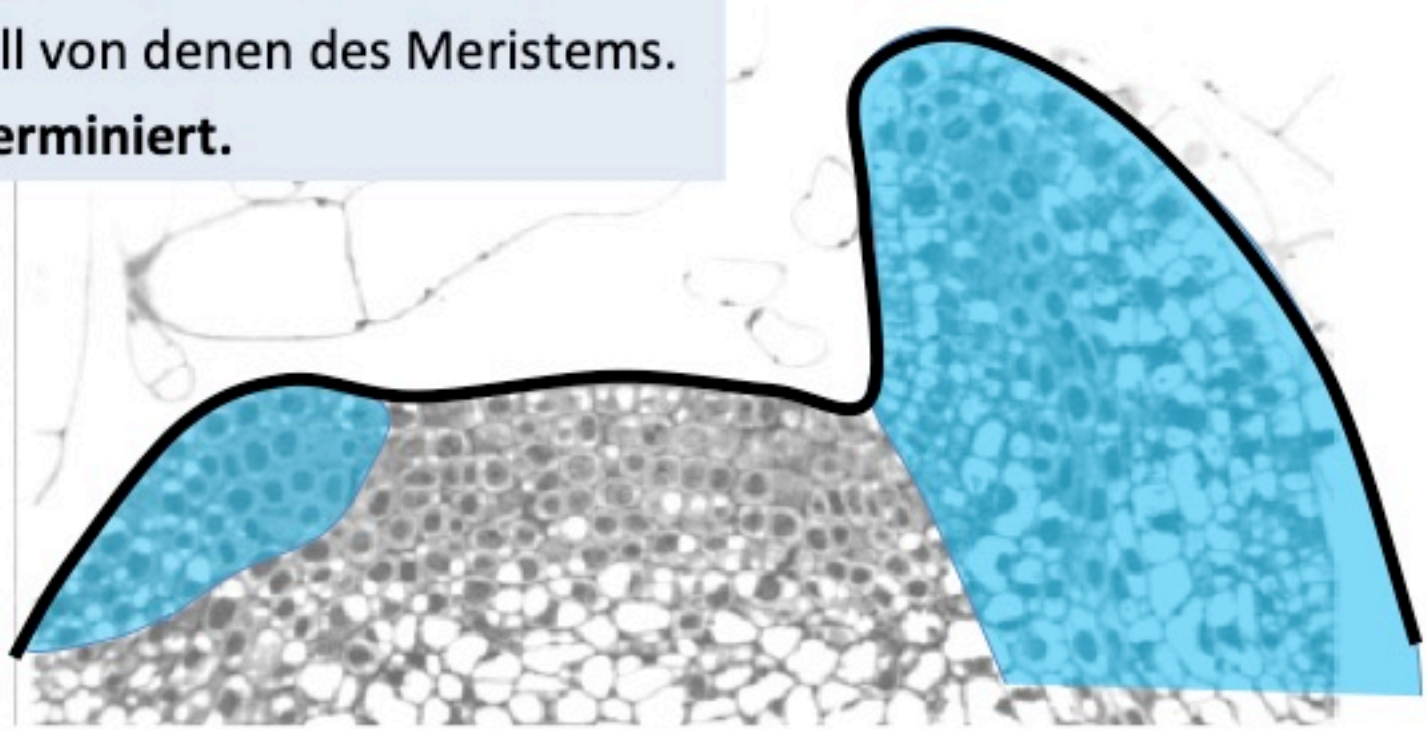
In der ***shootmeristemless*** Mutante wird **kein SAM** angelegt. Dieser Phänotyp kann durch **Cytokinin** (CK) **Applikation** oder durch **Expression des *IPT* Gens** (aus dem CK-Biosyntheseweg) im SAM **(teilweise) aufgehoben**.

Der Transkriptionsfaktor STM induziert die Expression von *IPT*.

Yanai, O., et al. (2005). *Arabidopsis* KNOXI Proteins activate cytokinin biosynthesis. Curr Biol. 15: 1566-1571.

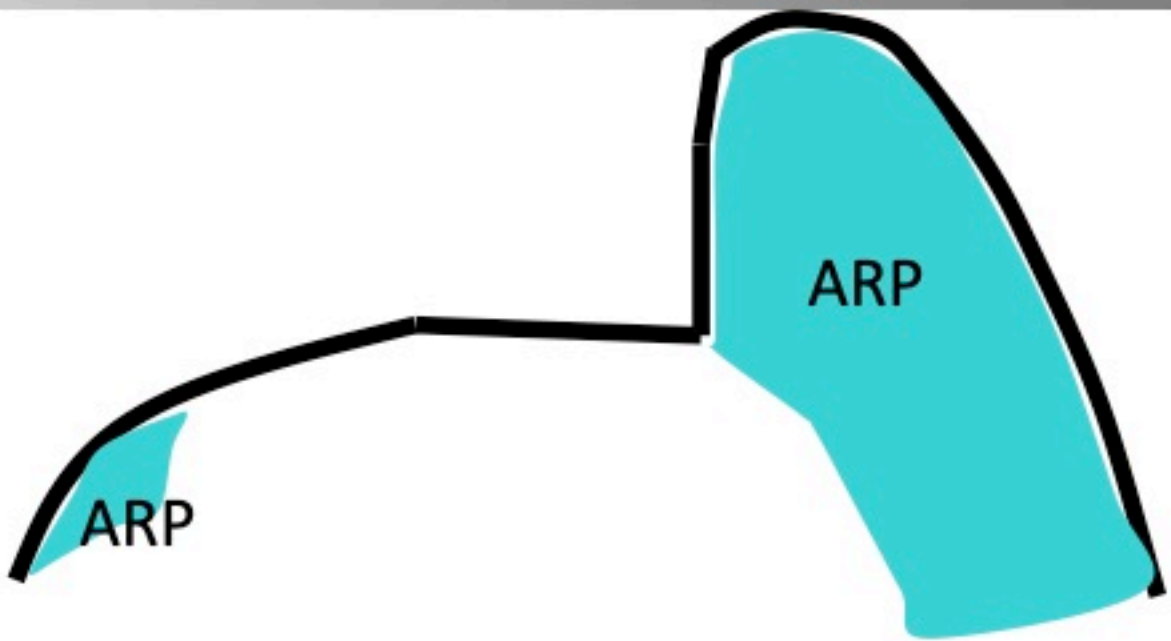
Zellen der Blattprimordien sind determiniert

- Zellen der **Blattprimordien** unterscheiden sich funktionell von denen des Meristems.
- Sie sind **determiniert.**



Poethig , R.S. and Sussex ,I.M. (1985) The developmental morphology and growth dynamics of the tobacco leaf. Planta 165: 158-169

Primordium-spezifische Gene fördern die Differenzierung

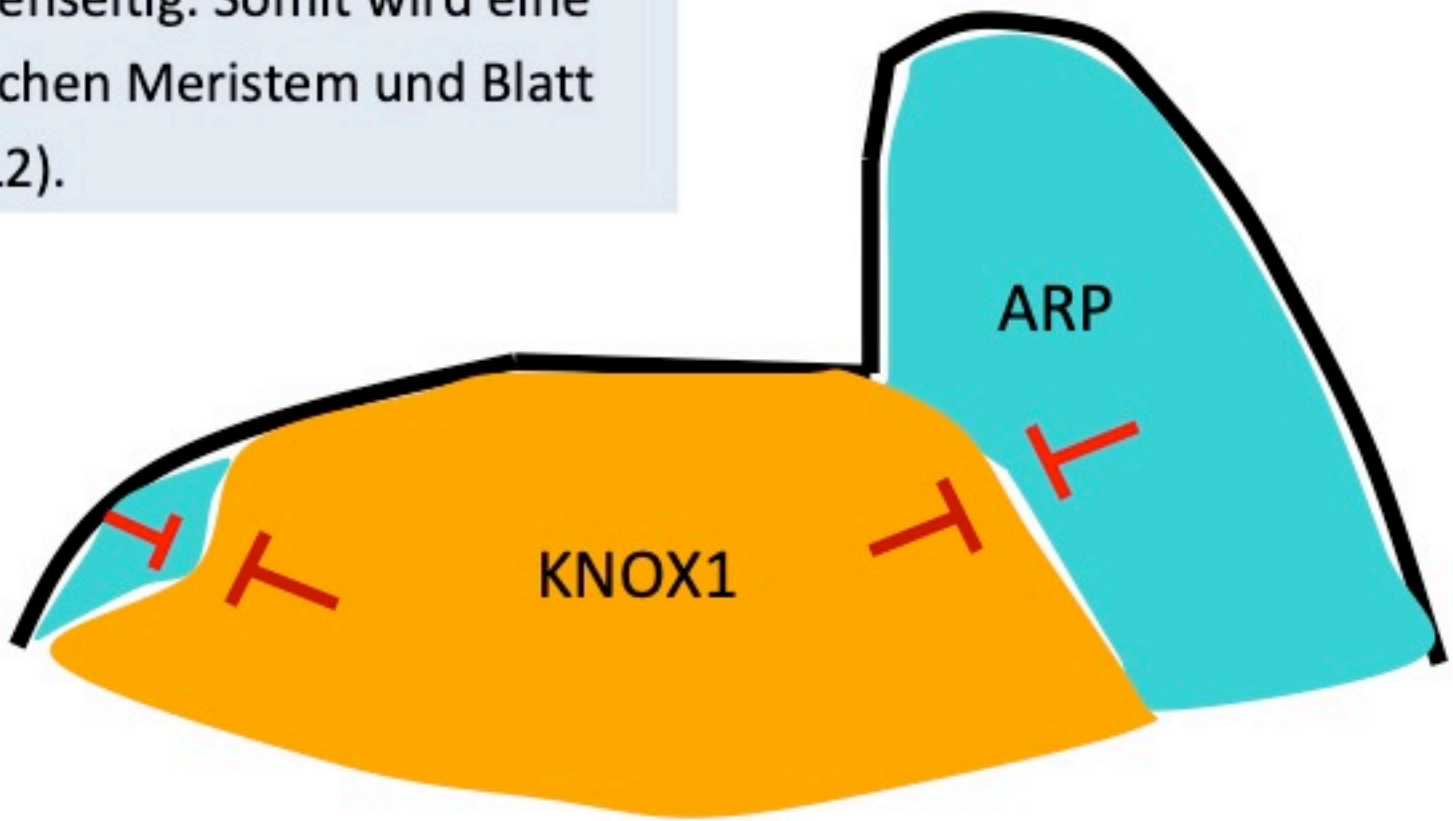


***ARP* Gene**

- *"**ARP**"* leitet sich von drei Genen ab, ***A**SYMMETRIC LEAF1, **R**OUGH SHEATH2* und ***P**HANTASTICA*
- *ARP* Gene codieren **MYB Transkriptionsfaktoren**
- sind in Blattprimordien exprimiert
- fördern **Differenzierung**

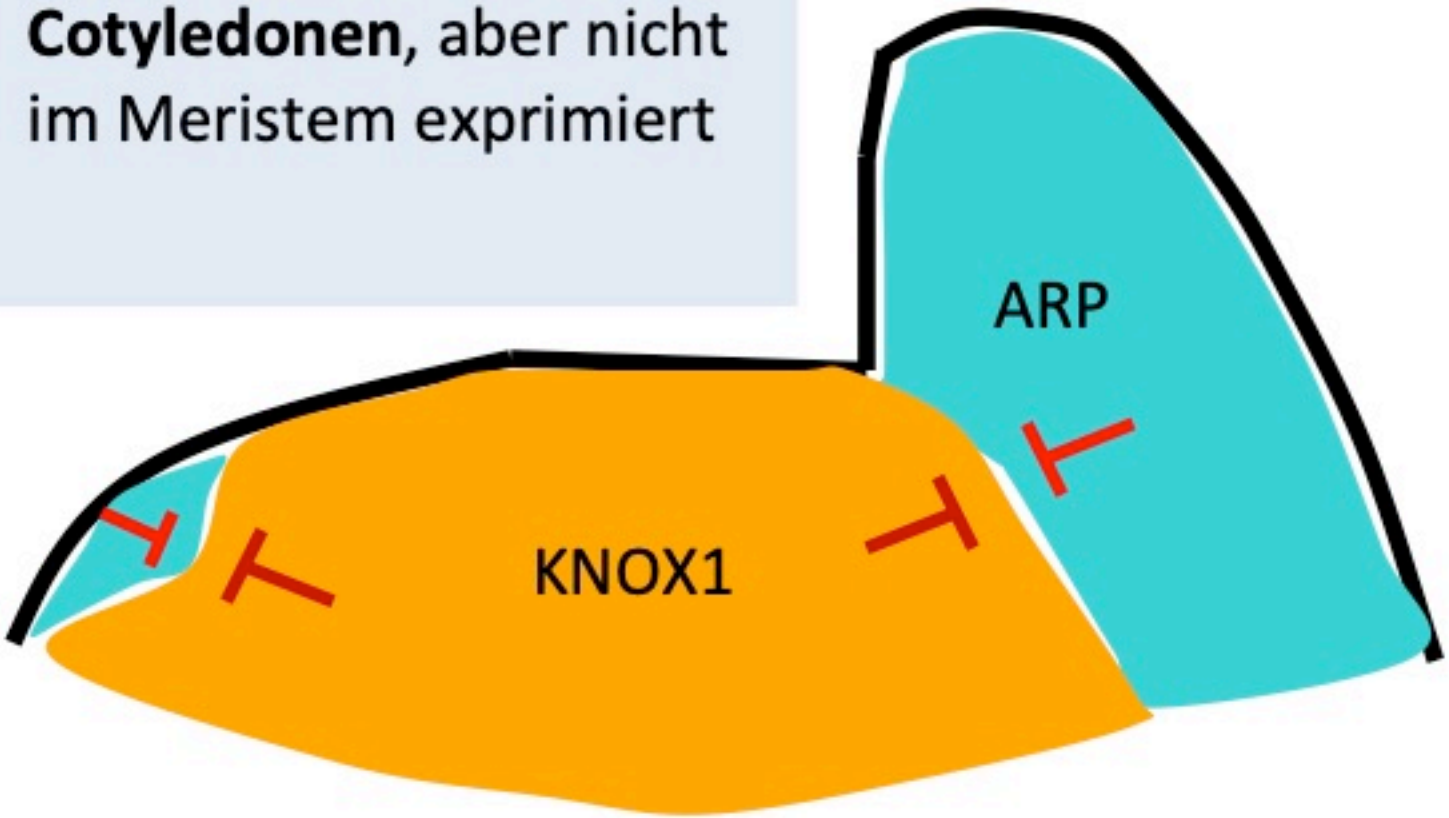
ARP und *KNOX1* Gene hemmen sich gegenseitig

Die zwei Klassen von Transkiptionsfaktoren hemmen sich gegenseitig. Somit wird eine klare Grenze zwischen Meristem und Blatt geschaffen (➔ VL2).



ASYMMETRIC LEAF 1 (AS1)

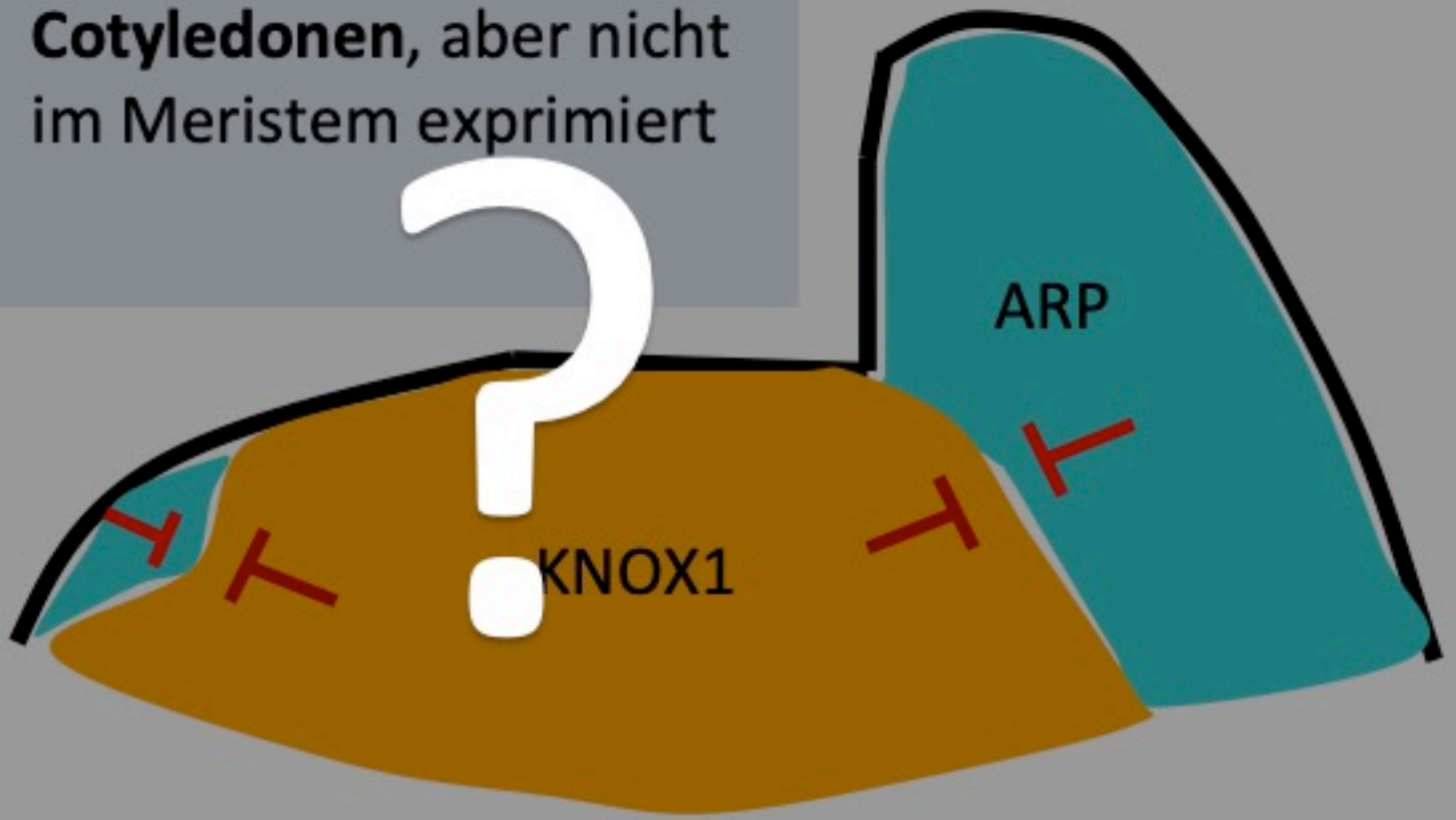
ASYMMETRIC LEAF1 *(AS1)* mRNA ist in den **Cotyledonen**, aber nicht im Meristem exprimiert



Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A. (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. Nature 408: 967-971.

Wie ist *ASYMMETRIC LEAF 1* in knox1 Mutanten exprimiert?

ASYMMETRIC LEAF1 *(AS1)* mRNA ist in den **Cotyledonen**, aber nicht im Meristem exprimiert



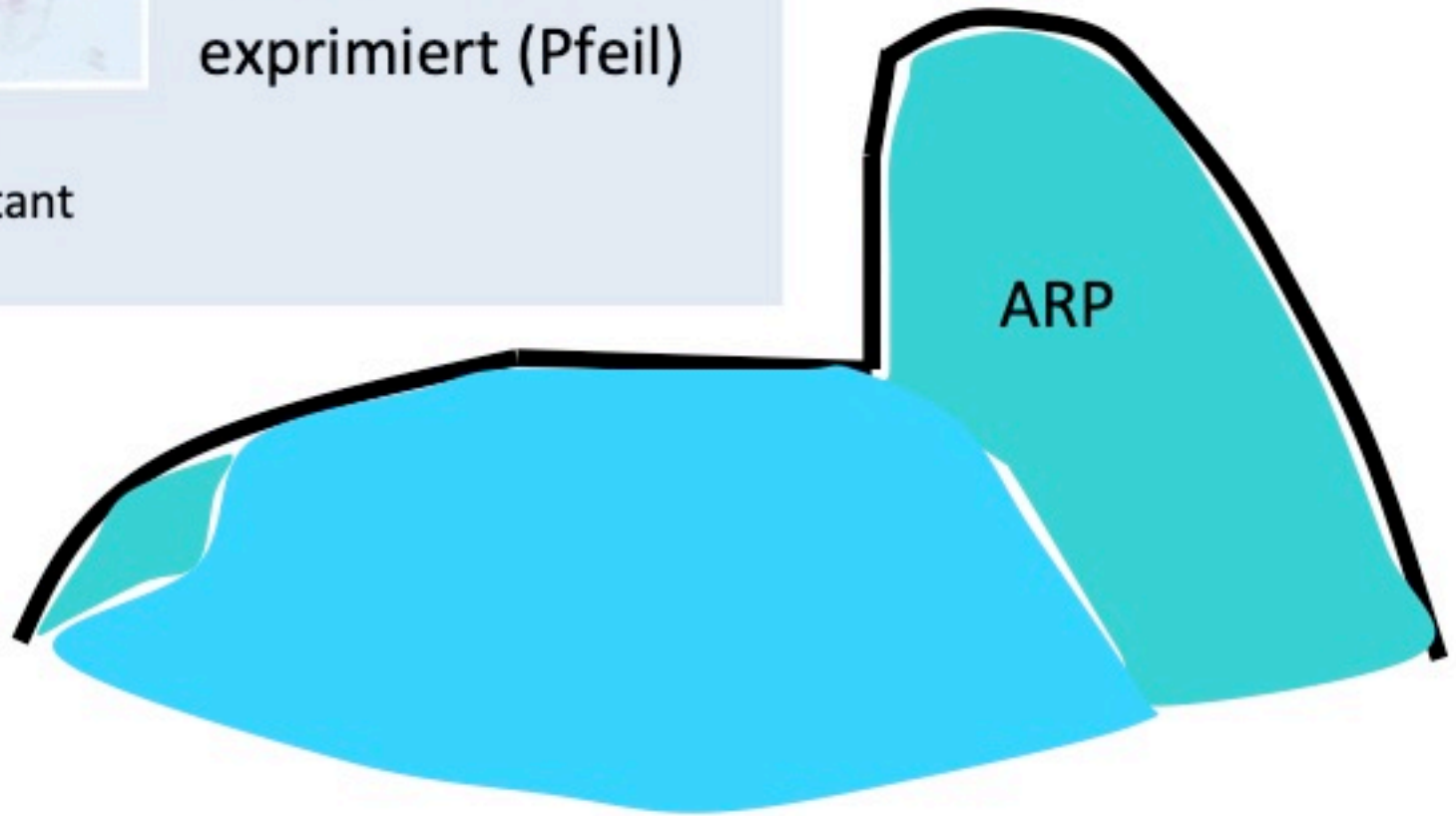
Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A. (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. Nature 408: 967-971

Die Expression von *AS1* breitet sich in *stm* Mutanten aus

Wild type

stm mutant

In der *stm* Mutante ist *AS1* auch im Meristem exprimiert (Pfeil)



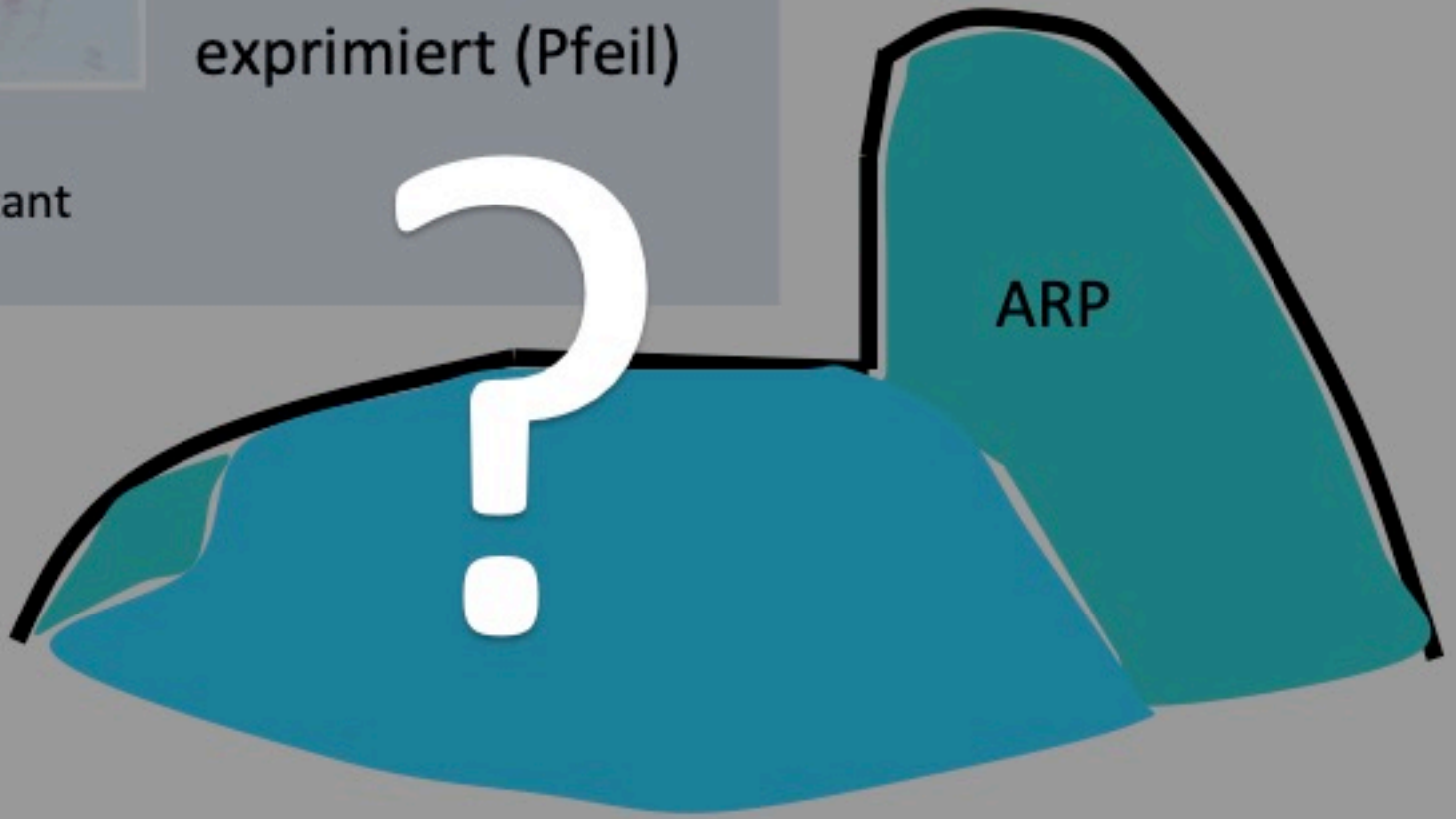
Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A. (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. Nature 408: 967-971.

Wie sehen Mutanten in *AS1* aus?

Wild type

stm mutant

In der *stm* Mutante ist *AS1* auch im Meristem exprimiert (Pfeil)

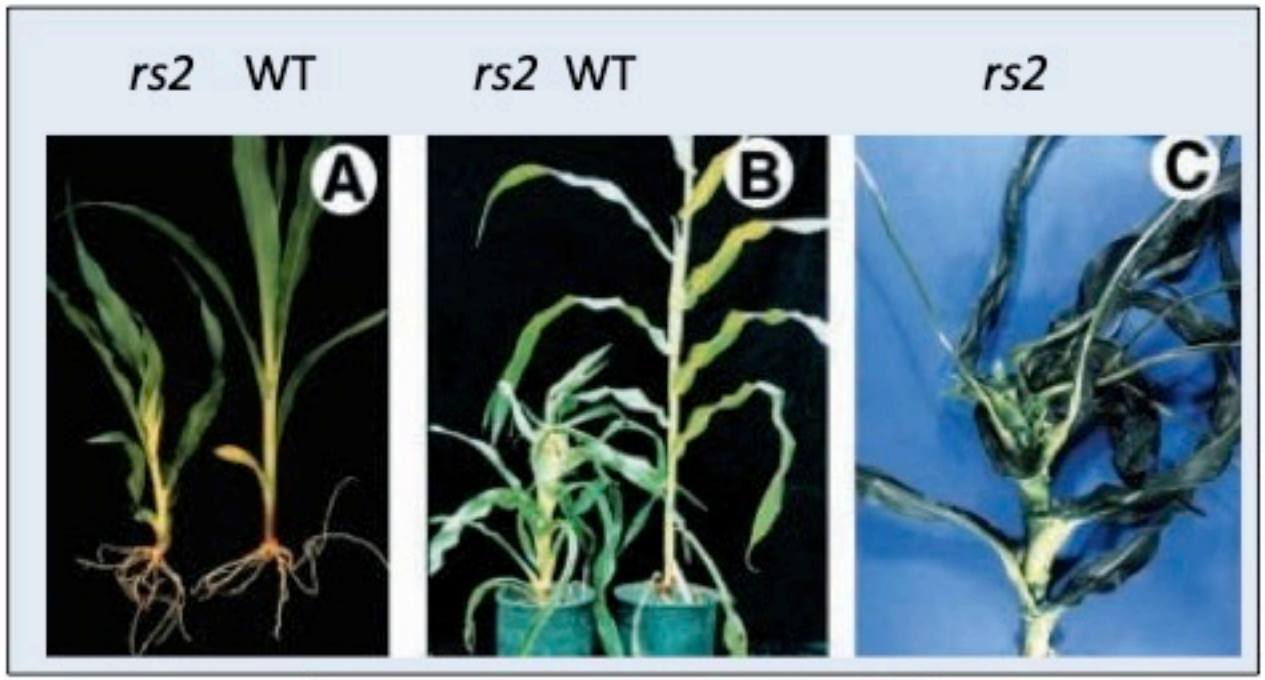


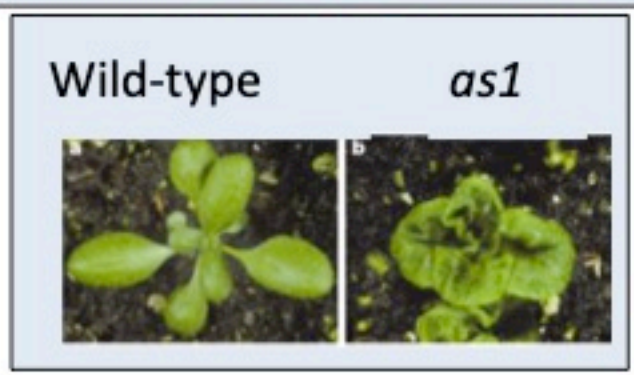
Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A. (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. Nature 408: 967-971.

Ein Verlust der *ARP* Genfunktion ähnelt der *KNOX1* Überexpression

Gain of function
in
Blattprimordien

KNOX-OE





Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A. (2000)
Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. Nature 408: 967-971.

Zusammenfassung I

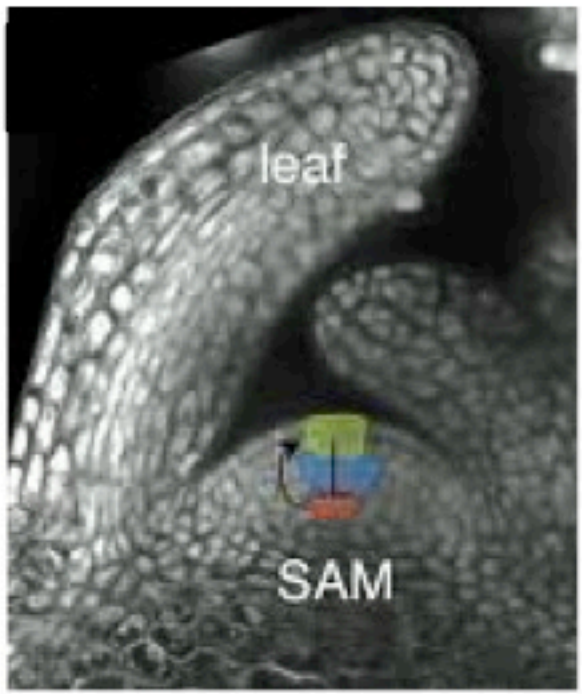
- Damit aus **meristematischen Zellen** ein **Blattprimordium** (Blattanlage) wird, findet eine genetische „**Umprogrammierung**“ statt.

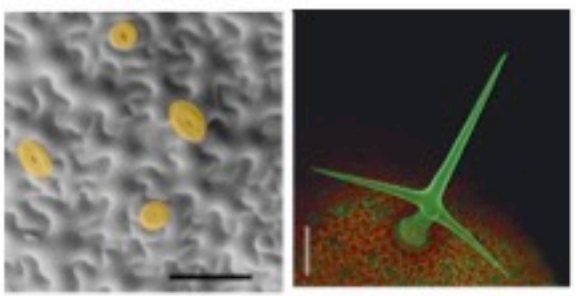
  → **Knox-1** Gene, die für den Aufbau des **Meristems** verantwortlich sind, werden im Primordium unterdrückt, während **ARP** Gene, die für **Differenzierungsprozesse** notwendig sind, exprimiert werden.

- **Knox-1 Gene** und **ARP Gene** haben **antagonistische** Wirkung.

- Knox-1 Gene und ARP Gene **hemmen ihre Expression gegenseitig**.

Konzepte der Vorlesung Blattentwicklung

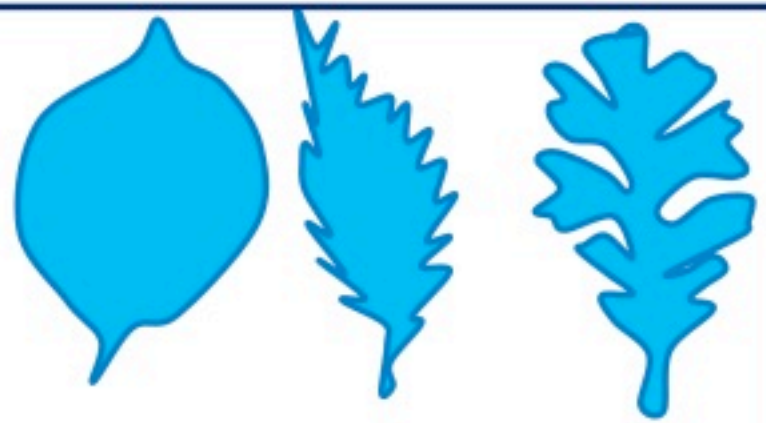




- Wie entsteht eine Blattanlage?
- **Wie entstehen zusammengesetzte Blätter?**

Kontrolle der Blattkomplexität

Einfach



Die **Spreite** kann **unzerteilt** sein oder **Einschnitte verschiedener Tiefe** aufweisen, besteht aus einer wenigstens entlang der Blattspindel (Rhachis) zusammenhängenden Fläche. Die Teile heißen dann Abschnitte.

➔ Bei Arabidopsis, Mais, Reis, etc.

Zusammen-gesetzt

Die Spreite ist in **mehrere, vollständig voneinander getrennte und gestielte Abschnitte zerteilt.** Diese Teile werden - unabhängig von ihrer Größe - **Blättchen** oder **Fiedern** genannt. Die Blättchen setzen an der Blattspindel (Rhachis) an, die der Mittelrippe des einfachen Blattes entspricht.

➔ Erbse, Tomate und *Cardamine hirsuta* sind genetische Modelsysteme um komplexe Blattformen zu untersuchen

Champagne, C., and Sinha, N. (2004). Compound leaves: equal to the sum of their parts? Development 131:4401-4412

KNOX1 Gene kontrollieren die Undifferenziertheit UND die Blattkomplexität

Methode: Überexpression (➔VL3) von KNOX-Faktoren

Gain of function
in Blattprimordien

KNOX-OE

Arabidopsis

WT *KNOX*-OE
(overexpression)

Tabak

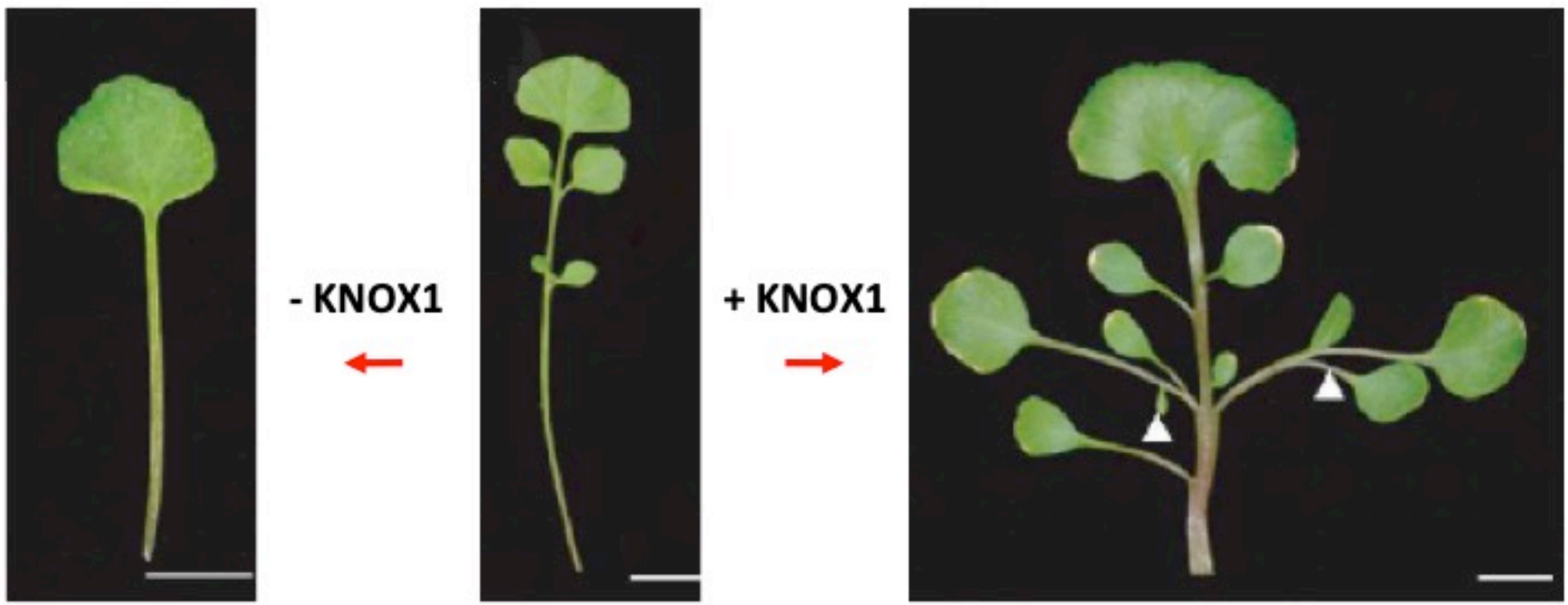
WT *KNOX*-OE

Mais

WT *KNOX*-OE

Chuck, G., Lincoln, C., and Hake, S. (1996) KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. Plant Cell 8: 1277-1289 ; Hake, S., and Ori, N. (2002) Plant morphogenesis and *KNOX* genes. Nat. Genet. 31: 121 – 122

Die Expression von KNOX1 korreliert mit der Komplexität eines Blattes

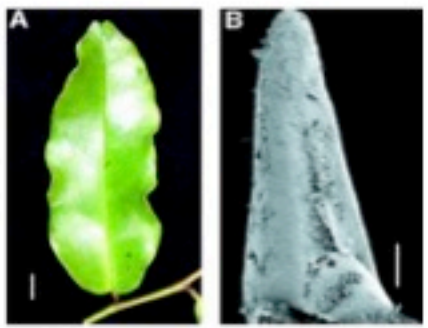


Wildtype
Cardamine hirsuta

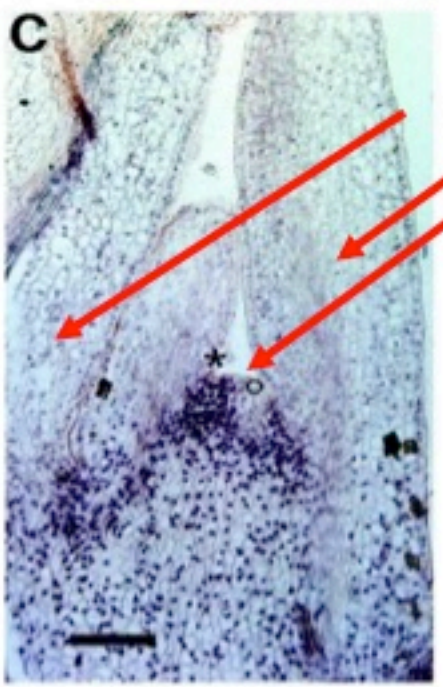
NATURE GENETICS 38: 942-947. Hay, A., and Tsiantis, M.The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsuta*. Copyright (2006).

Expression von KNOX1 in einfachen Blättern

Einfache Blätter



In Pflanzen mit einfachen Blättern ist die *KNOX1* Expression in den Primordien ausgeschaltet.

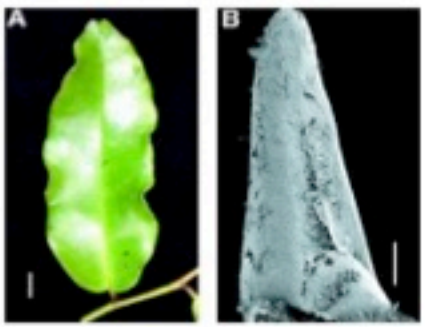


KNOX1 OFF in Blättern

Bharathan, G., Goliber, T.E., Moore, C., Kessler, S., Pham T., and Sinha, N.R. (2002) Homologies in leaf form inferred from *KNOXI* gene expression during development. Science 296: 1858-1860.

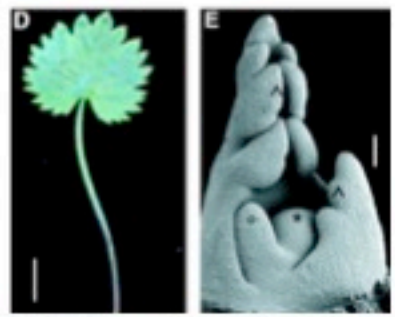
....und in zusammengesetzten Blättern

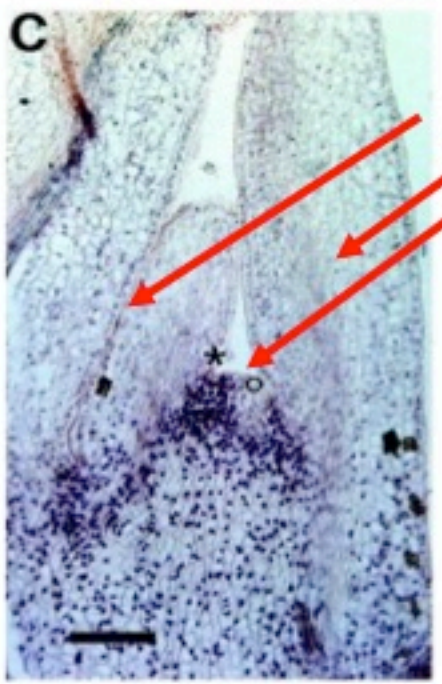
Einfache Blätter



In Pflanzen mit zusammen-gesetzten Blättern wird die *KNOX1* Expression in den Primordien wieder angeschaltet.

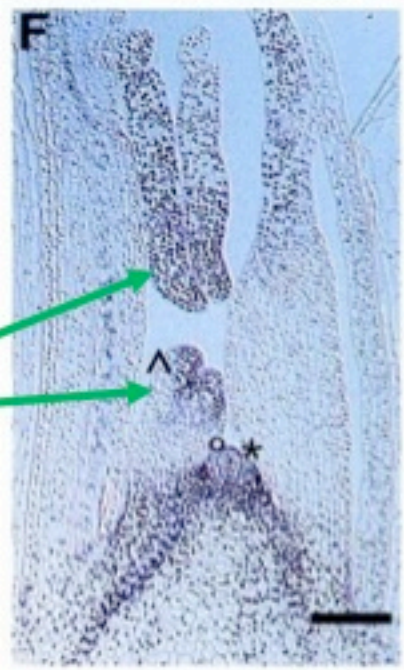
Zusammengesetzte





KNOX1 OFF in Blättern

KNOX1 ON in Blättern



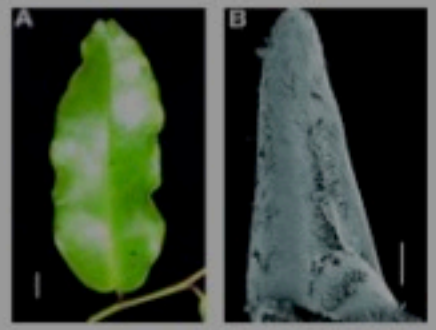
Bharathan, G., Goliber, T.E., Moore, C., Kessler, S., Pham T., and Sinha, N.R. (2002) Homologies in leaf form inferred from *KNOXI* gene expression during development. Science 296: 1858-1860.

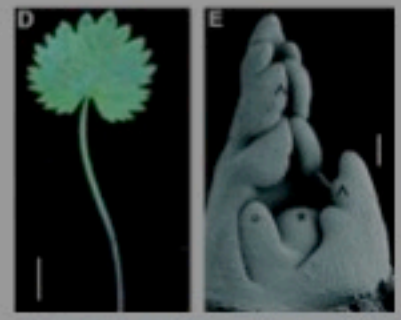
Was passiert, wenn man die Cytokinin-Dosis in zusammengesetzten Blättern ändert?

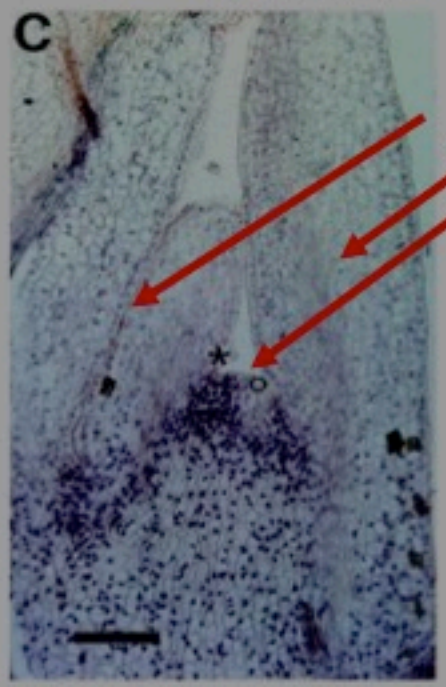
Einfache Blätter

Zusammengesetzte

In Pflanzen mit zusammengesetzten Blättern wird die *KNOX1* Expression in den Primordien wieder angeschaltet.



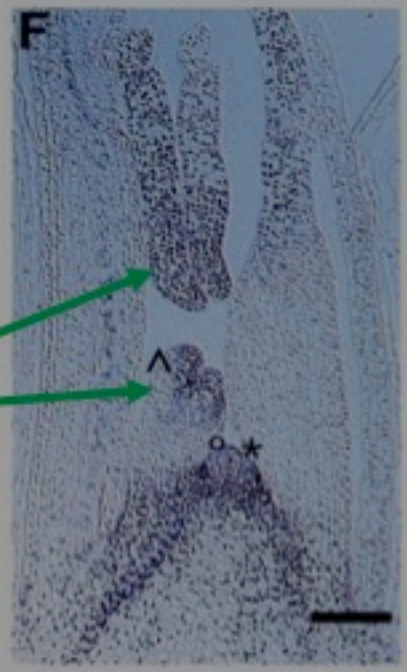




KNOX1 OFF in Blättern

?

KNOX1 ON in Blättern



Bharathan, G., Goliber, T.E., Moore, C., Kessler, S., Pham T., and Sinha, N.R. (2002) Homologies in leaf form inferred from *KNOXI* gene expression during development. Science 296: 1858-1860.

Cytokinin Signaltransduktionsweg ist auch an der Entwicklung von zusammengesetzten Blättern beteiligt

KNOX1

↓

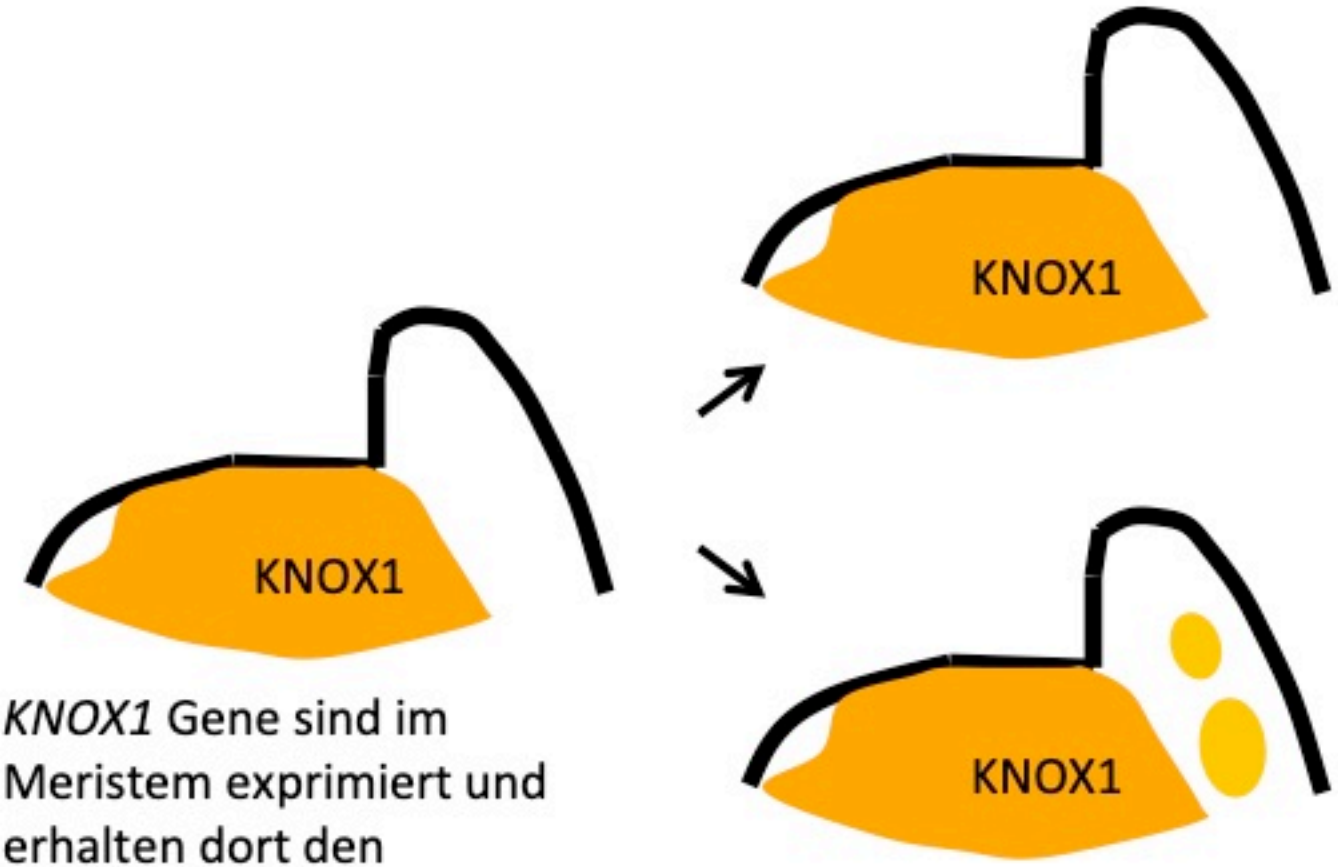
Cytokinin Biosynthese

↓

Blättchen-Proliferation

Shani, E., Ben-Gera, H., Shleizer-Burko, S., Burko, Y., Weiss, D., and Ori, N. (2010). Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. Plant Cell 22: 3206–3217.

KNOX1 Gene spielen eine wiederkehrende Funktion bei der Blattentwicklung



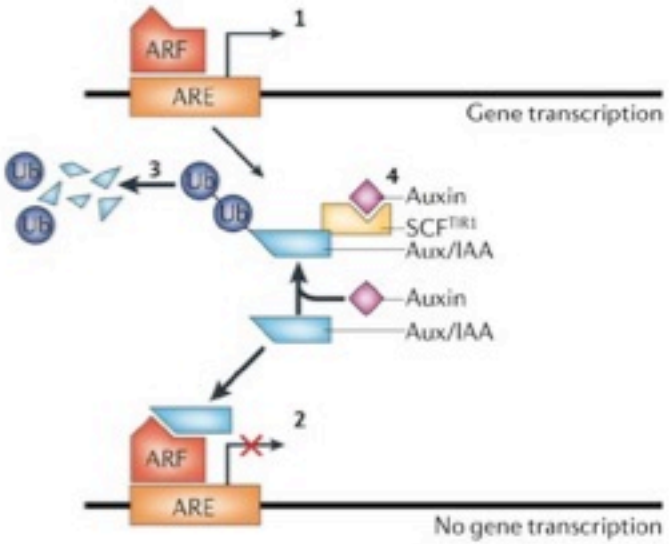
KNOX1 Gene sind im Meristem exprimiert und erhalten dort den undifferenzierten Zusatand der Stammzellen

In einfachen Blätter (z.B. *Arabidopsis*) sind die *KNOX1* in den Primordien nicht angeschaltet.

In zusammengesetzten Blättern (z.B. Cardamina) werden die *KNOX1* Gene in den Blattprimordien angeschaltet und vermitteln organogenetische Aktivität am Blattrand

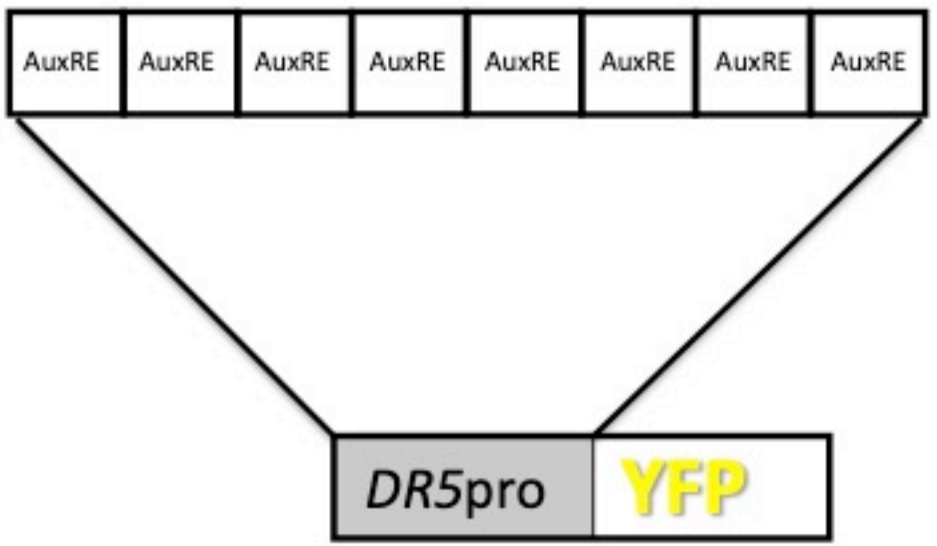
Wie kann man eine Hormon-konzentrationen genetisch messen?

Auxin Funktionsweise ➔ VL2

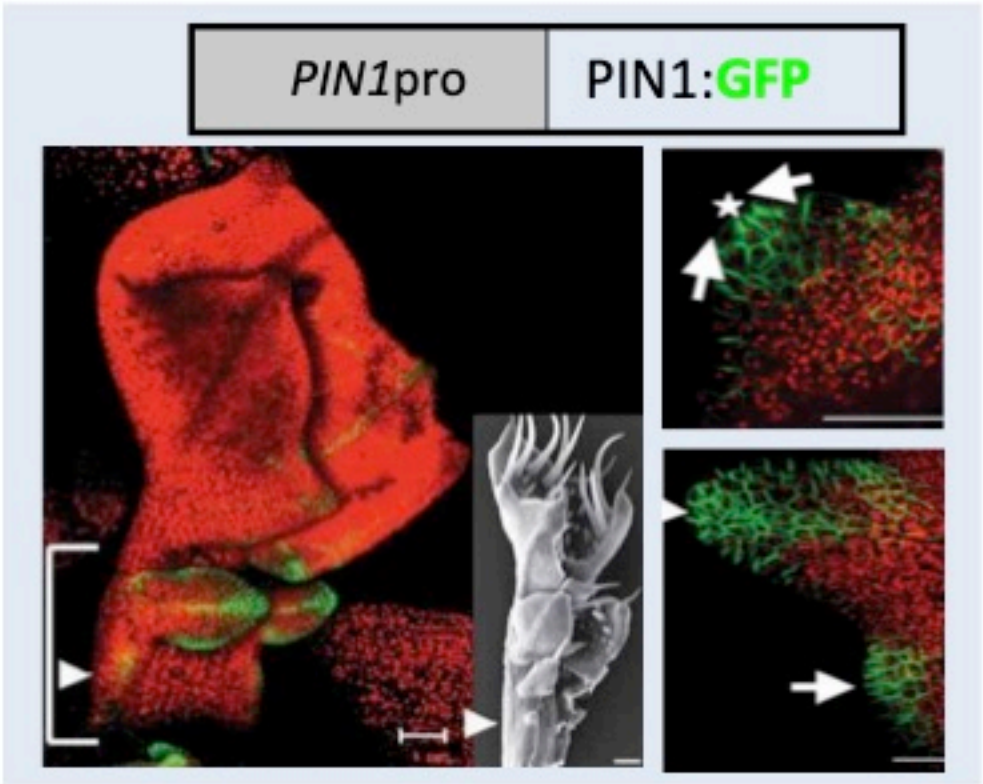


Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

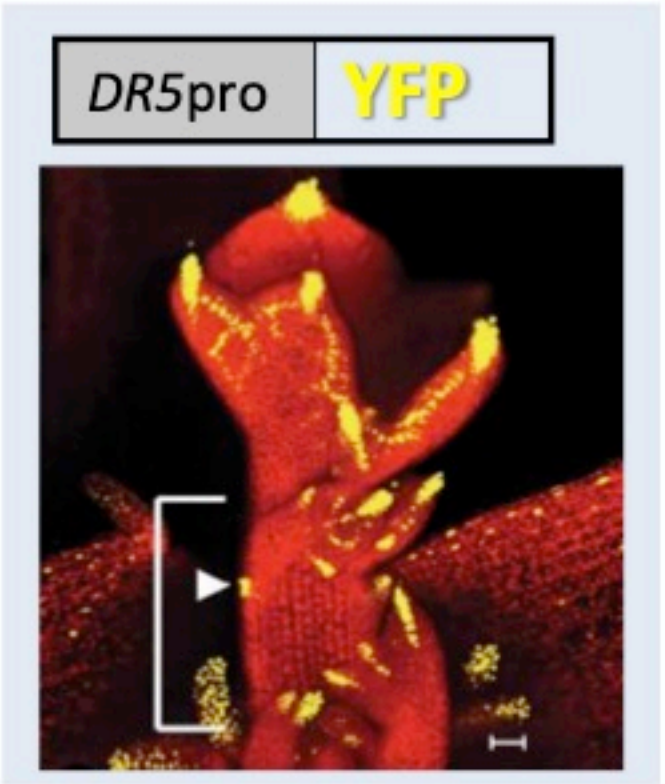
7–9 Wiederholungen der **ARF Bindestelle** TGTCTC (Auxin responisive element, **AuxRE**) gefolgt von einem **Markergen** wie der β-Glucuronidase (GUS), Luciferase oder einem Fluoreszierendem Protein GFP oder YFP



Eine erhöhte Auxinkonzentration geht der Blättchenbildung voran



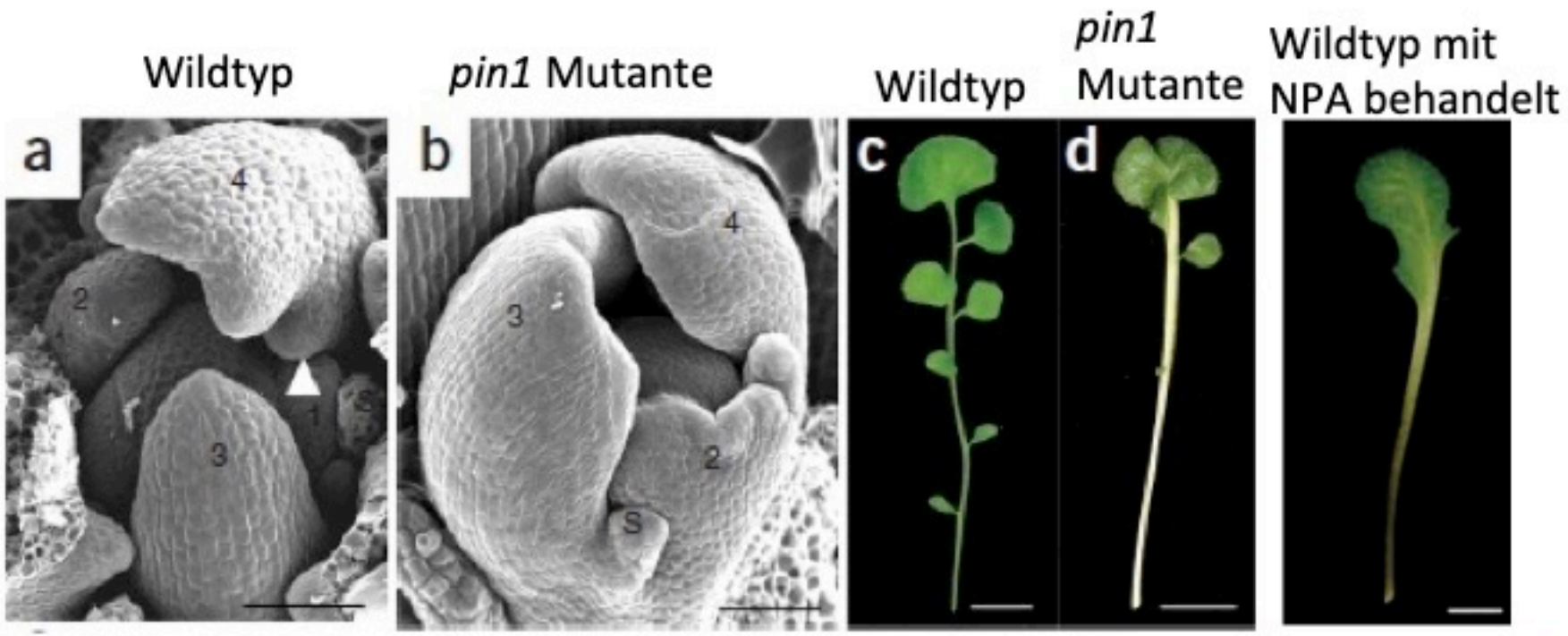
PIN1 leitet den Auxinfluss zur Initiationsstelle der Blättchen



Auxin Anreicherung geht der Bildung von Blättchen voran

Barkoulas, M., Hay, A., Kougioumoutzi, E., and Tsiantis, M. A developmental framework for dissected leaf formation in the Arabidopsis relative *Cardamine hirsuta*. Nat. Genet. 40: 1136-1141.

Polarer Auxintransport ist notwendig für die Bildung von zusammengesetzten Blättern



In der amorphen *pin1* Mutante von *Cardamine hirsuta*, oder in *Cardamine* Blättern, die mit einem Inhibitor des Auxintransportes (NPA) behandlet wurden, werden keine Blättchen mehr gebildet.

Barkoulas, M., Hay, A., Kougioumoutzi, E., and Tsiantis, M. A developmental framework for dissected leaf formation in the Arabidopsis relative *Cardamine hirsuta*. Nat. Genet. 40: 1136-1141.

Zusammenfassung II – Zusammengesetzte Blätter

Erbse, Tomate und *Cardamine hirsuta* sind gute Modellsysteme, um die Entwicklung von zusammengesetzten Blättern zu untersuchen.

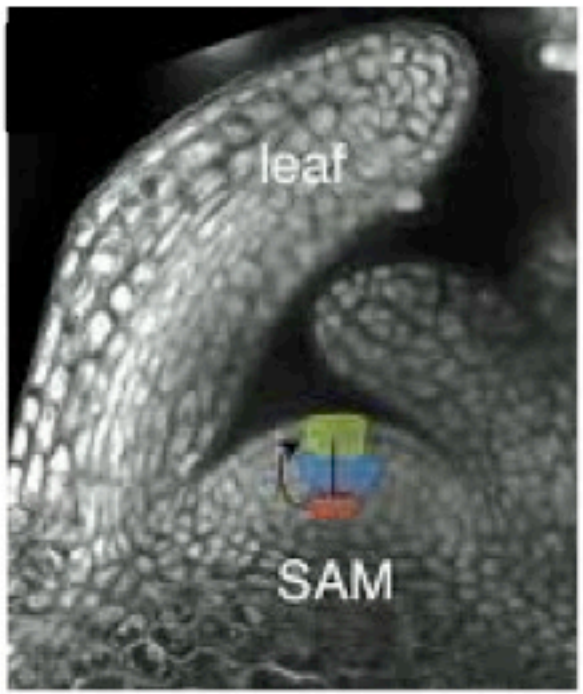
KNOX1 Gene spielen eine wiederkehrende Funktion bei der Entwicklung von zusammengesetzten Blättern, zunächst bei der Funktion des Meristems, dann für die Initiation der Blättchen.

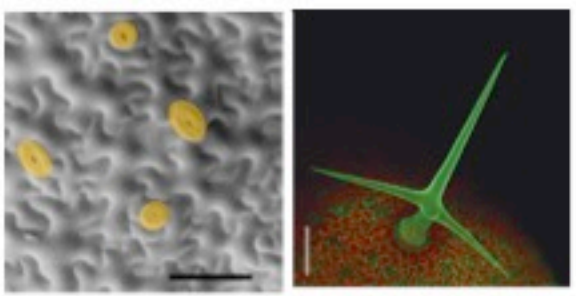
Dabei agieren KNOX1 Gene mittels des Cytokinin-Signaltransduktionsweges (zwei-Komponenten Signaling, VL1).

Auf das Pflanzenhormon Auxin spielt bei der Initiation der Blättchen auch eine wichtige Rolle und in *pin1* Mutanten fehlen die Blättchen.

Auxin-Konzentrationen können genetisch gemessen werden.

Konzepte der Vorlesung Blattentwicklung

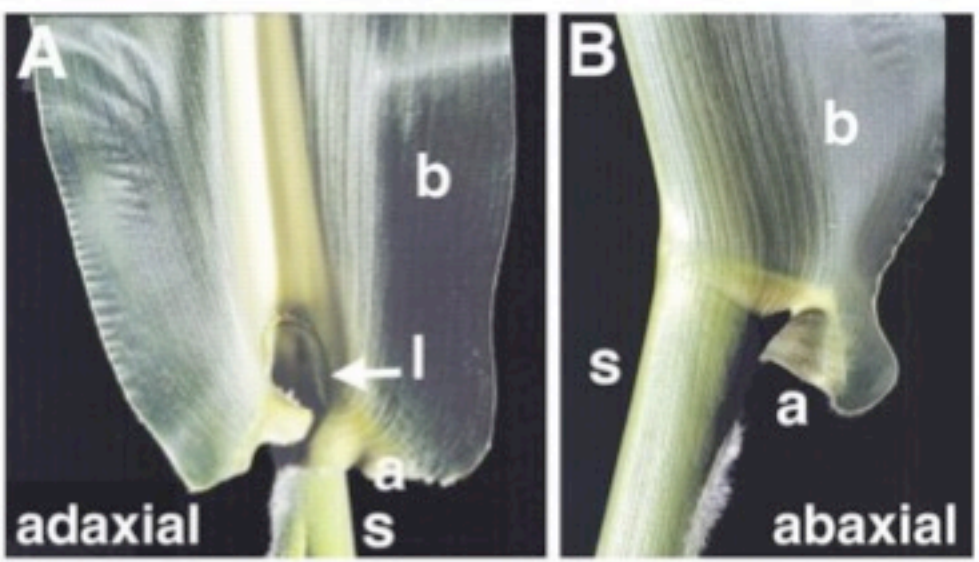


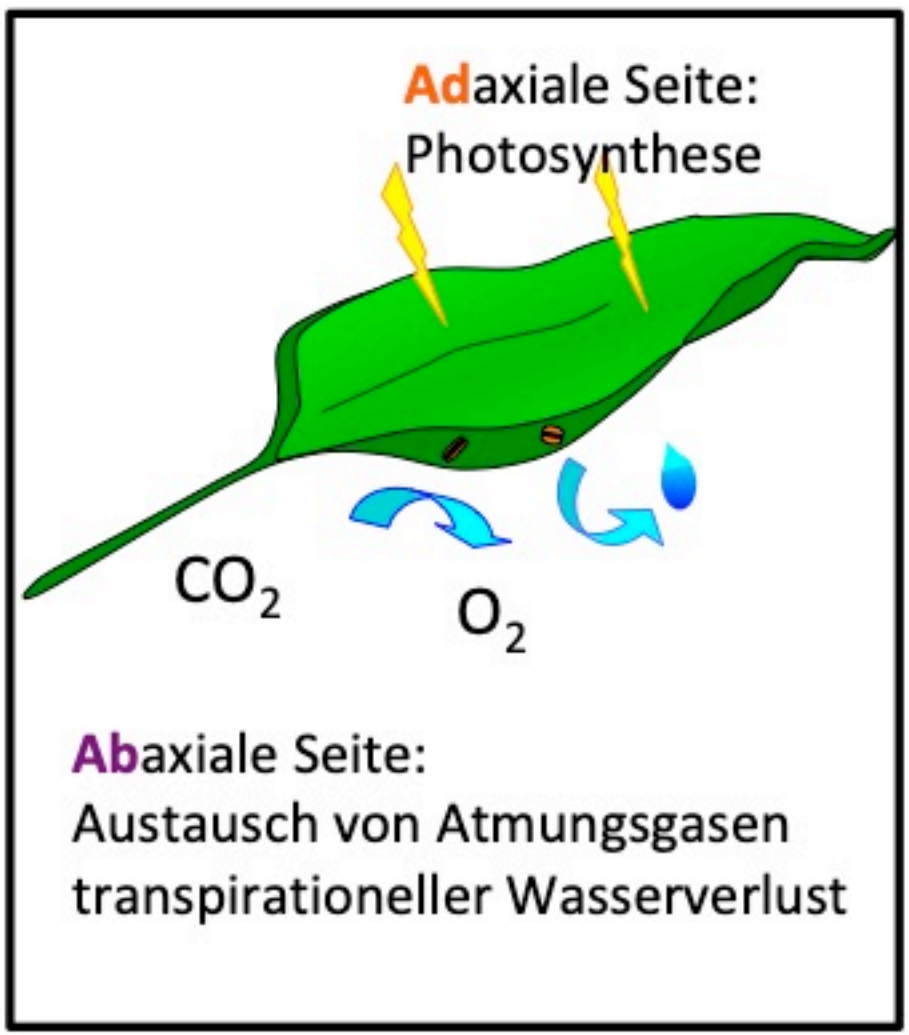


- ☞ Wie entsteht eine Blattanlage?
- ☞ Wie entstehen zusammengesetzte Blätter?
- ☞ **Wie entsteht Blatt-Polatiät?**

Blattpolarität

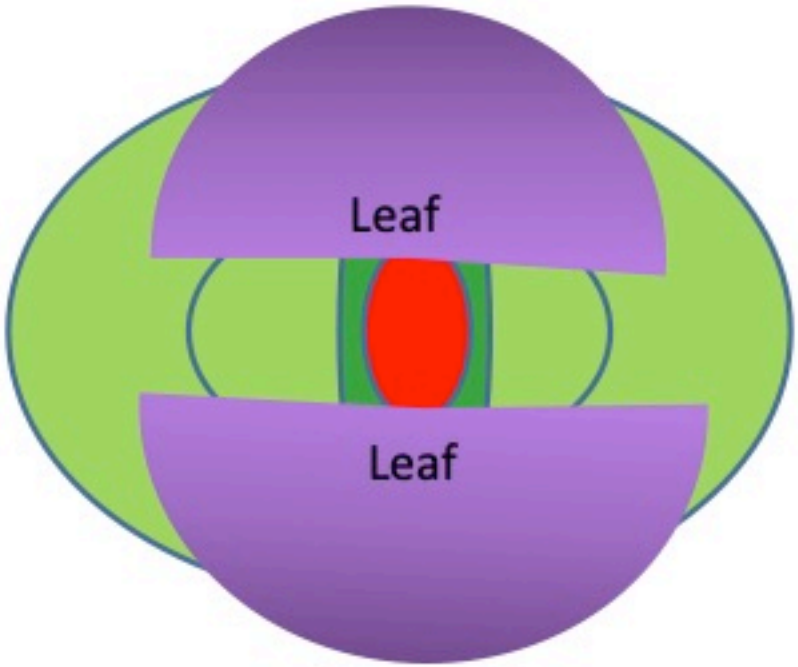
Die meisten Blätter sind polar: **Blattober-** und **Blattunterseite** unterscheiden sich funktionell und anatomisch

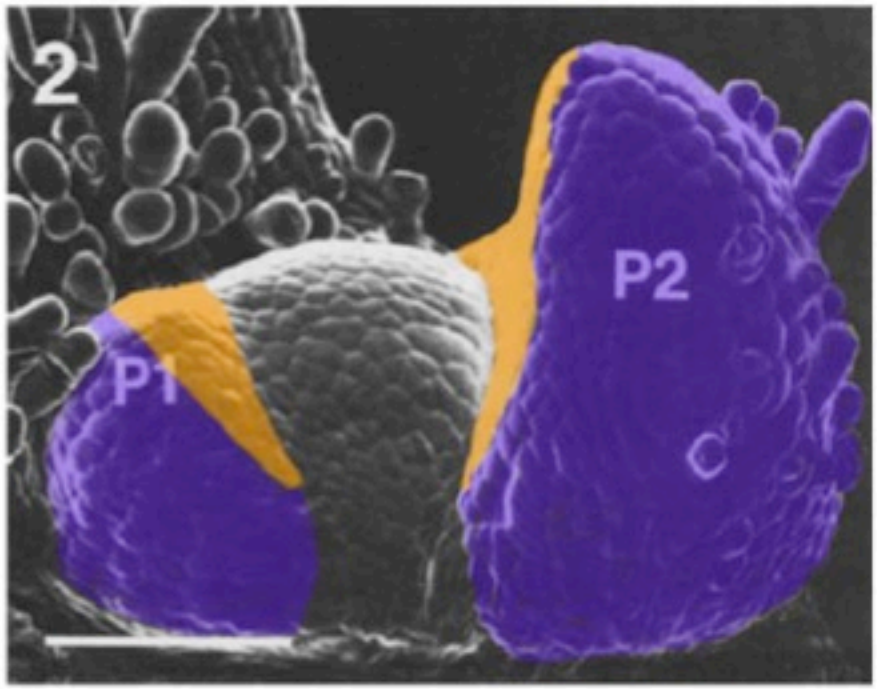




Juarez, M. T., Twigg, R.W., and Timmermans, M.C.P. (2004) Specification of adaxial cell fate during maize leaf development. Development 131: 4533-4544.

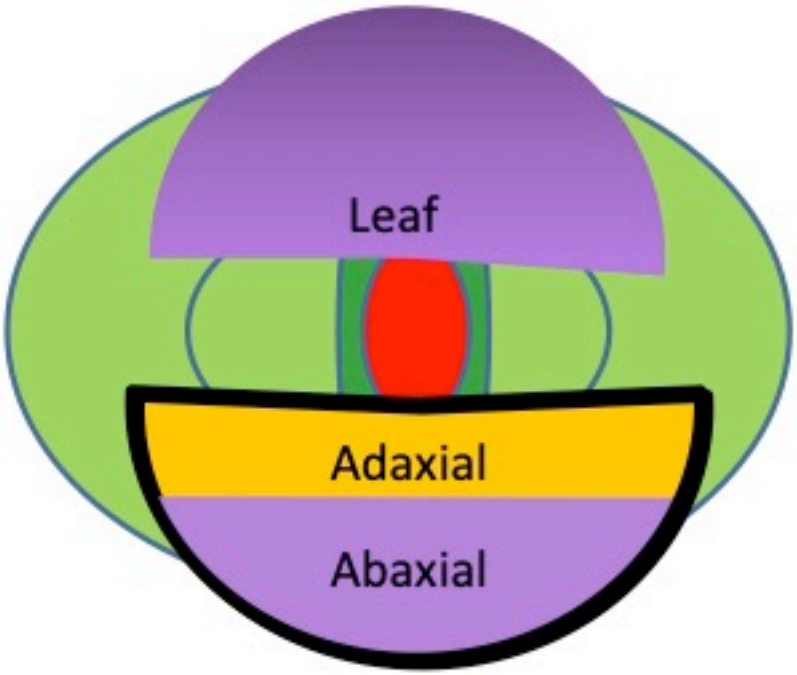
Etablierung der Blattpolarität

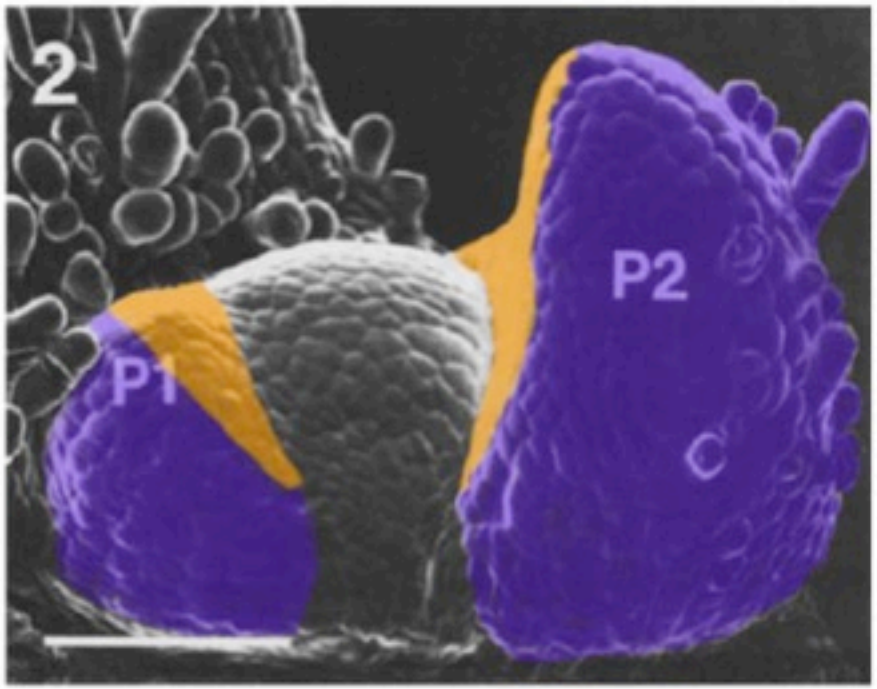




Blattprimordien haben schon **sehr früh eine Polarität**, da eine Seite dem **Meristem zugewandt** und die andere **abgewandt** ist.

Etablierung der Blattpolarität

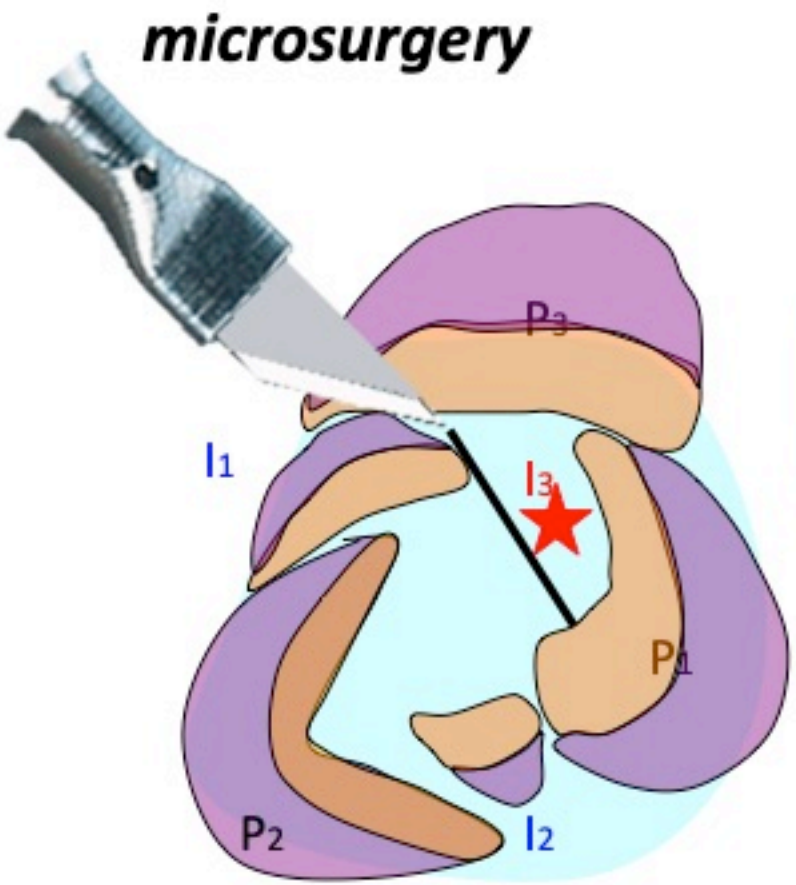




Die Meristemseite ist adaxial, die abgewandte Seite abaxial

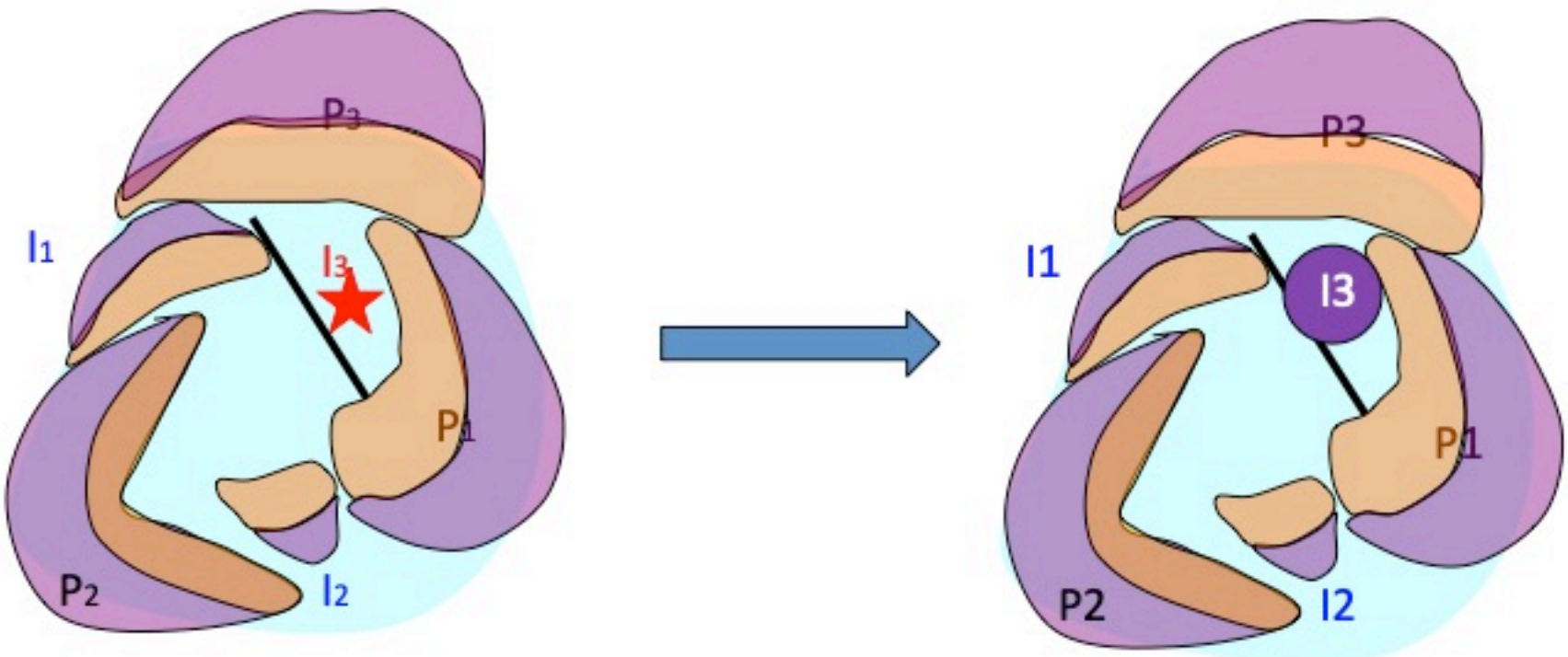
Woher "weiß" das Blatt welche Seite welche ist?

Experimentelle Studien zur Blattpolarität



Junge Primordien wurden durch einen kleinen Schnitt vom Meristem getrennt

Microsurgery

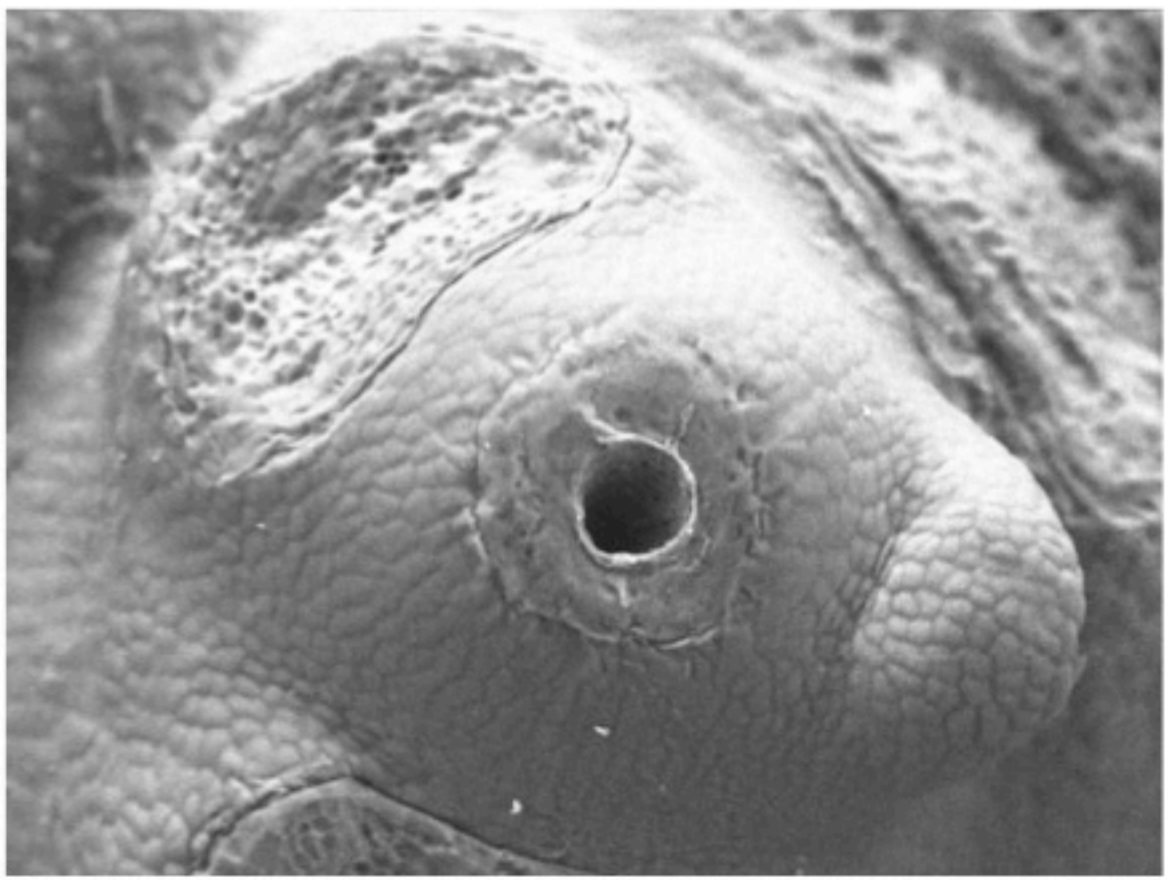


Das isolierte Primordium **verliert die Polarität**

(es ist komplett **ab**axialiert) und ist **radiär-symmetrisch**.

Laser-Ablationsexperimente

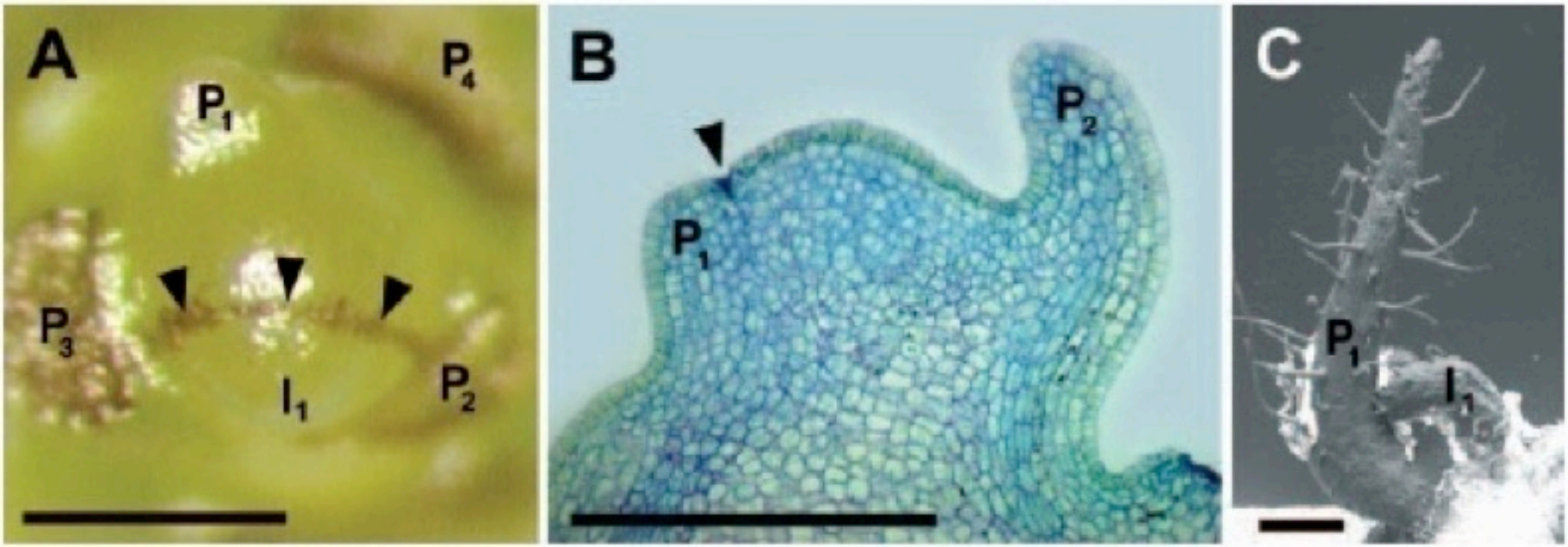
Methode Laser-Ablation (➔ VL2)



Meristem einer Tomatenpflanze, bei der die Zentrale Zone durch einen Infrarot-Laser entfernt wurde

Reinhardt et al Development (2003) 130, 4073

Laser-Ablationsexperimente



Neuere Experimente haben gezeigt, dass eine Laserablation der epidermalen Zellschicht ausreicht, damit das Primordium seine adaxiale Polarität verliert.

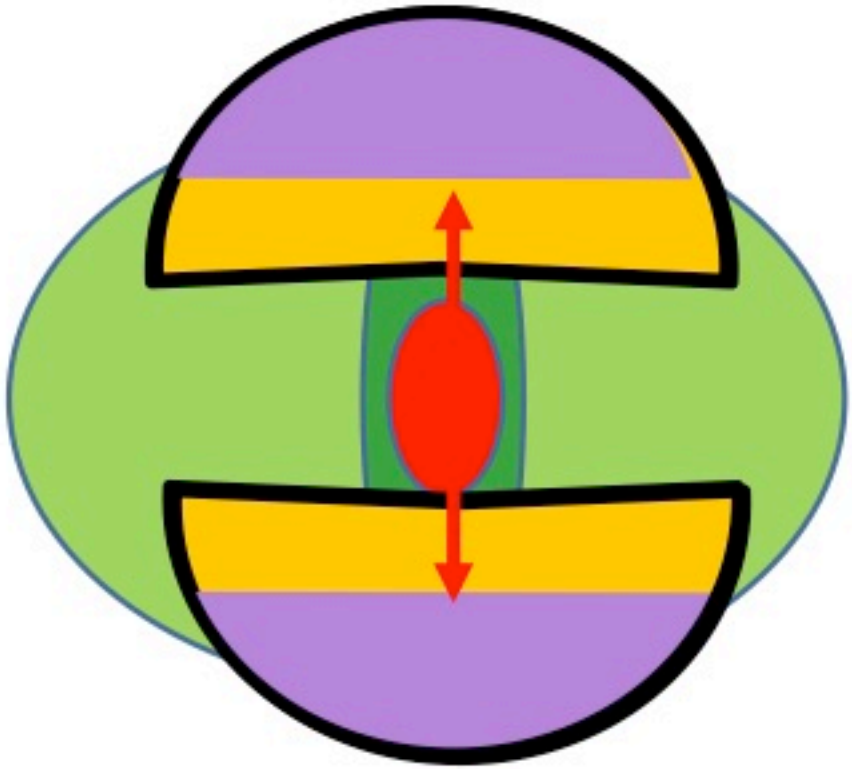
Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2005) Microsurgical and laser ablation analysis of leaf positioning and dorsoventral patterning in tomato. Development 132: 15-26.

Etablierung der Blattpolarität

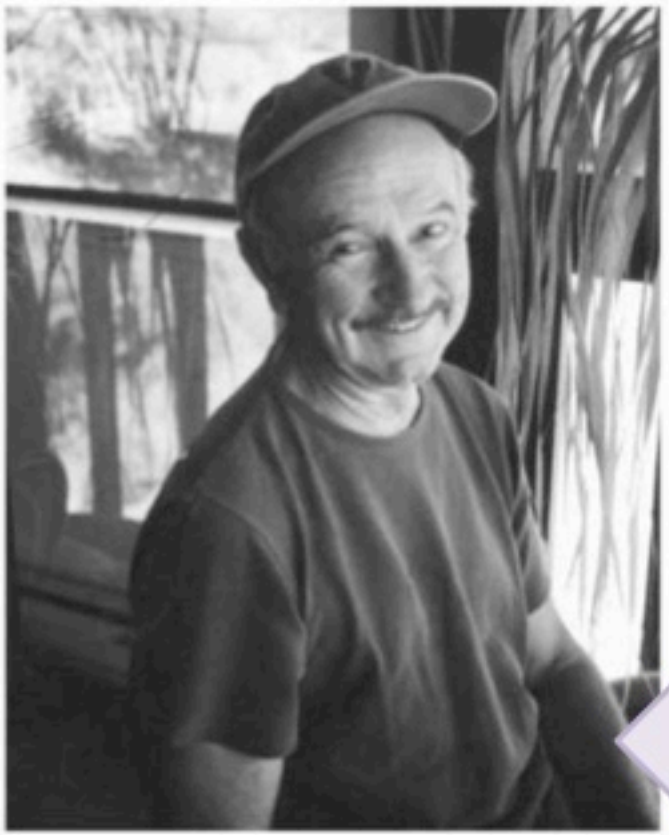
- Ein Signal aus dem Meristem gelangt über die Epidermis ins junge Primordium

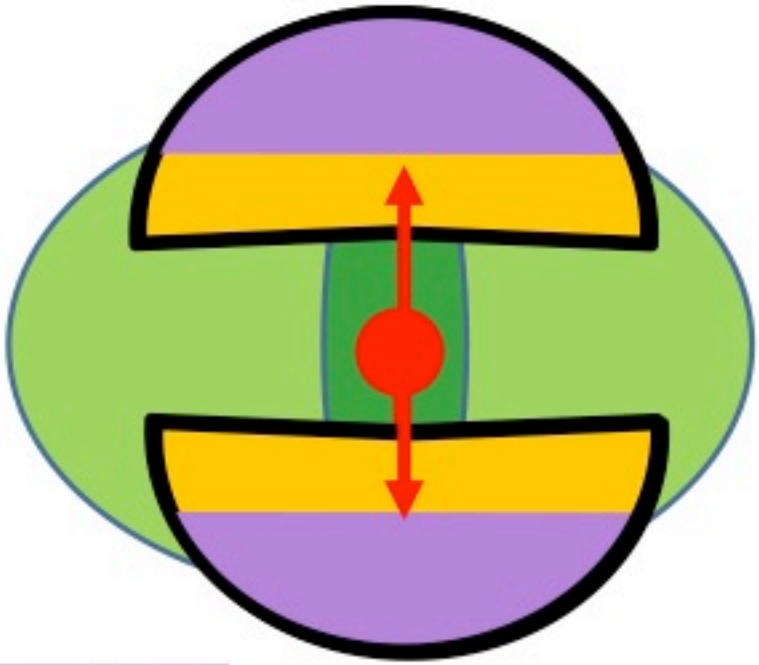
- Das Signal liefert Informationen bezüglich der **ad**axialen Position

- Die Natur dieses Signals ist bisher unbekannt



This unbekannte Signal wird das *Sussex* Signal genannt





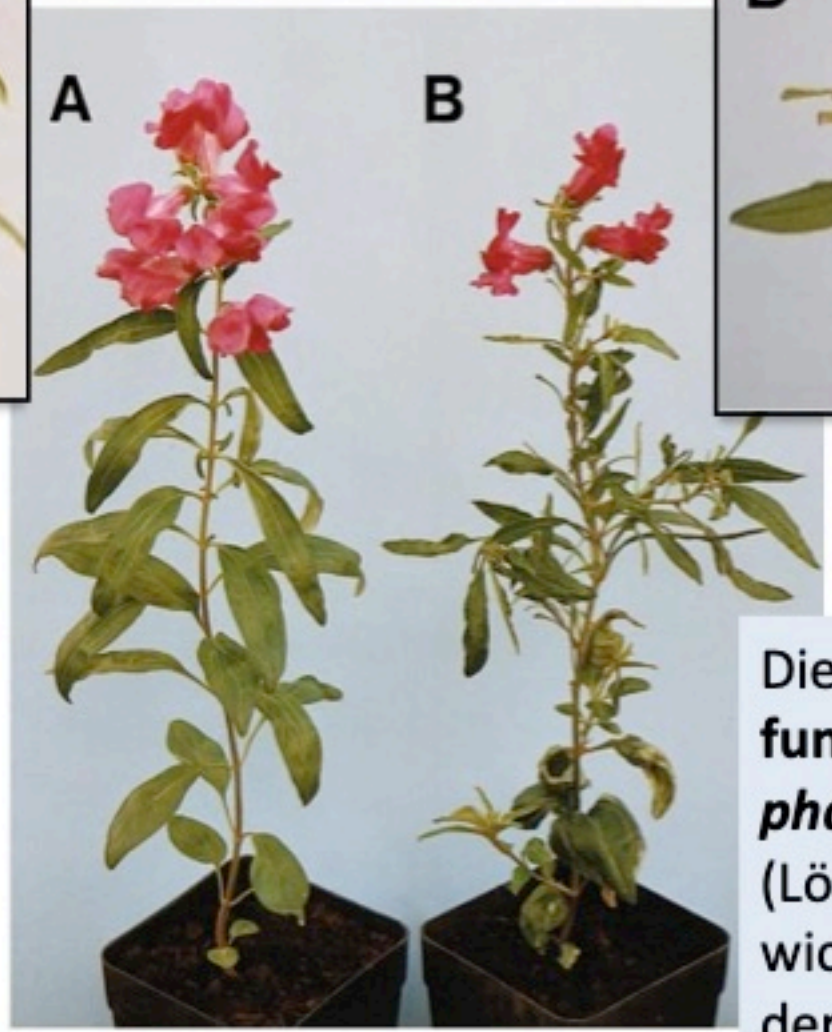
Ian Sussex postulierte in den 1950s, dass ein Signal vom Meristem für die Blattpolarität wichtig ist.

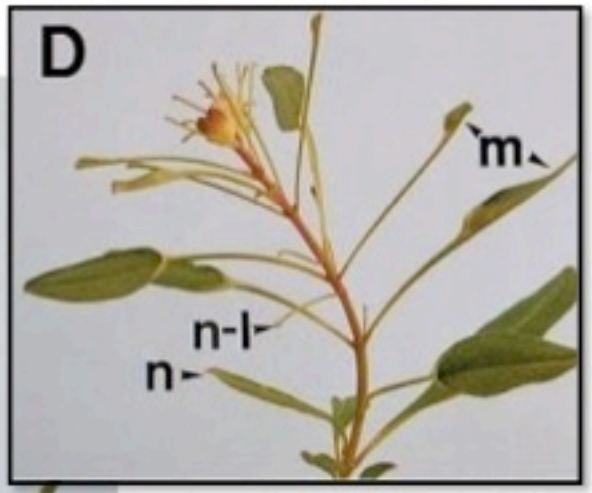
Ian Sussex

Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Volume 49 (c) 1998 by Annual Reviews www.annualreviews.org

Genetische Studien zur Blattpolarität

Wildtype



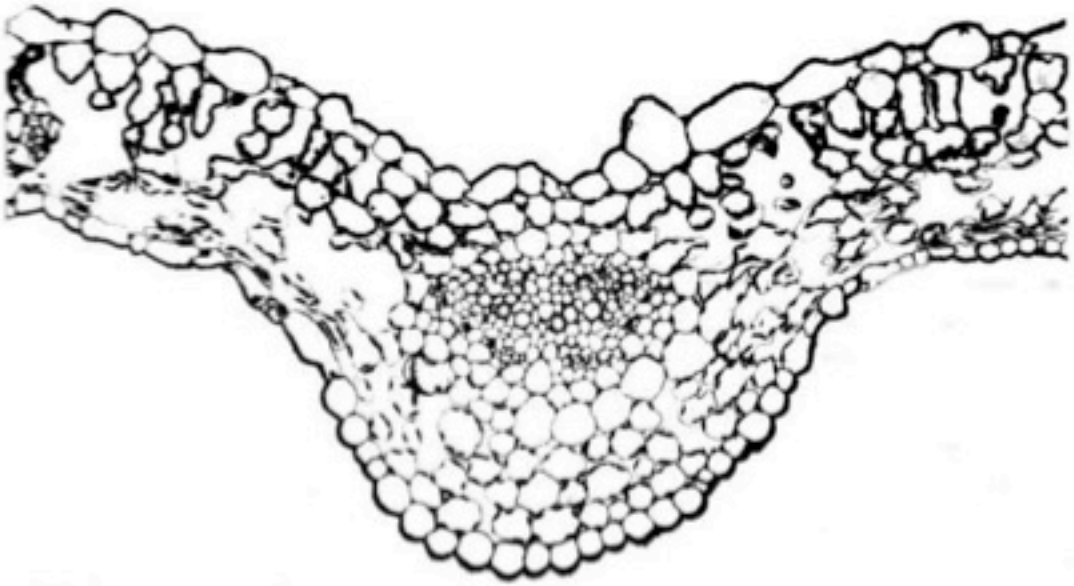


phan

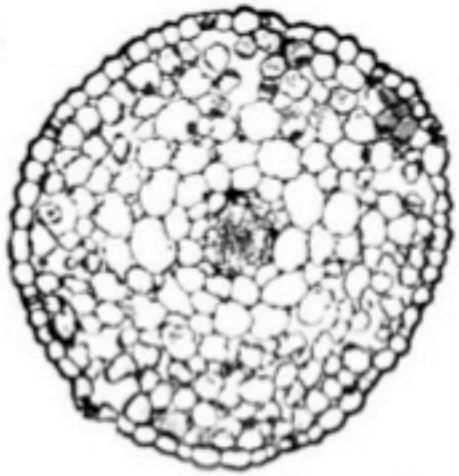
Die amorphe (**loss-of-function**)-Muntante ***phantastica*** von ***Antirrhinum*** (Löwenmäulchen) lieferte wichtige Hinweise bezüglich der Blatt-Polarität

Waites, R., and Hudson, A. (1995) *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. Development 121: 2143 – 2154.

Die *phantastica* Mutante



Wildtype Blatt

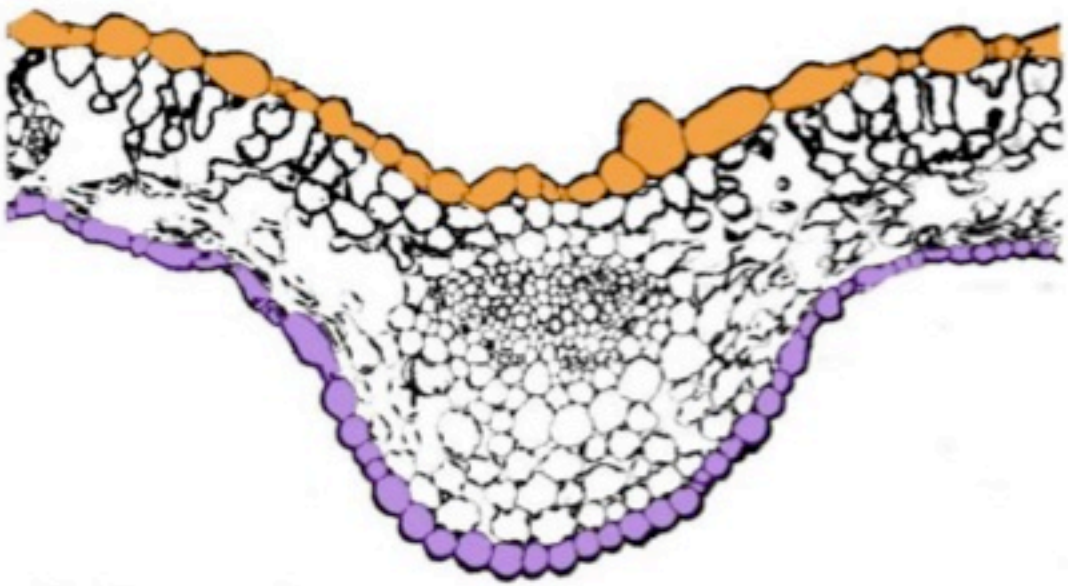


***phan* mutantes Blatt**

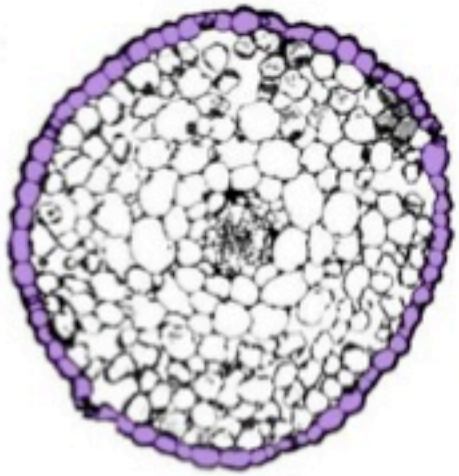
Die *phantastica* Mutante hat **radiärsymmetrische** Blätter.
PHAN codiert für einen **Transkriptionsfaktor**

Waites, R., and Hudson, A. (1995) *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. Development 121: 2143 – 2154.

Die *phantastica* Mutante



Wildtype Blatt

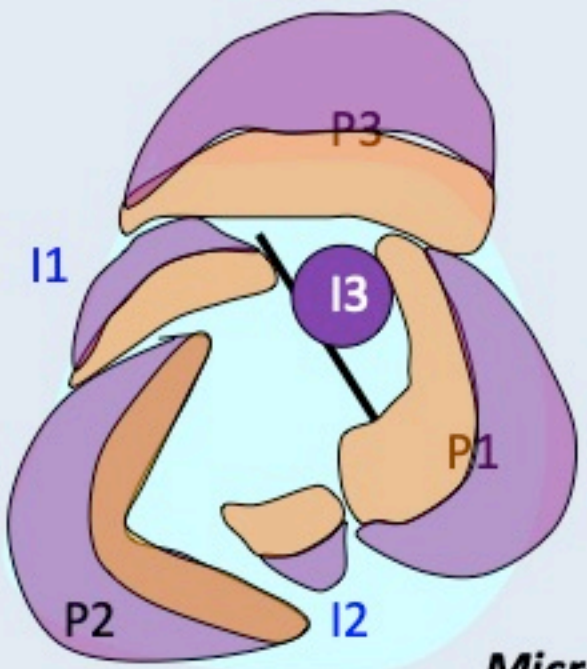


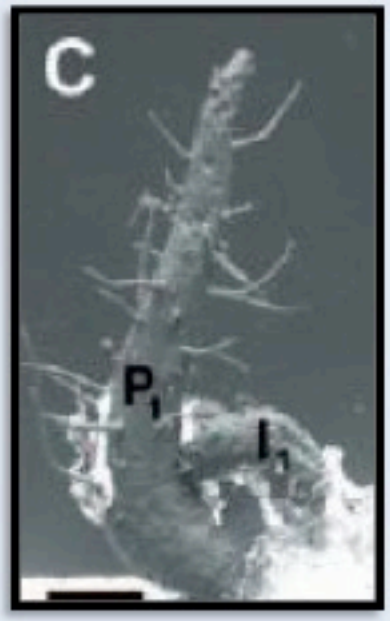
***phan* mutantes Blatt**

Blätter der *phan* Mutante sind **ab**axialisiert; PHAN scheint für die **ad**axiale Zellidentität wichtig zu sein.

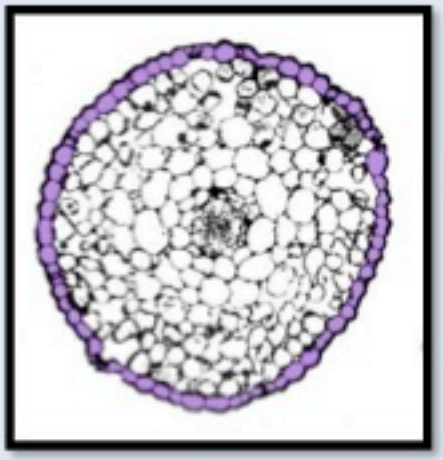
Waites, R., and Hudson, A. (1995) *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. Development 121: 2143 – 2154.

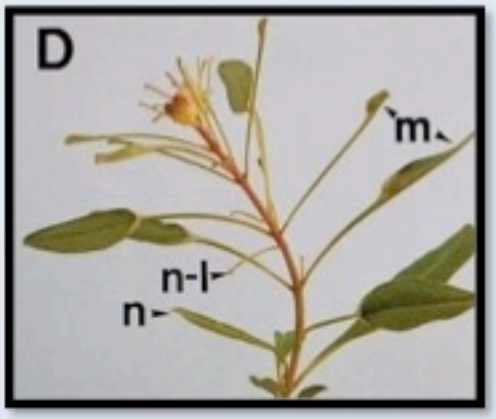
Blätter der *phan* Mutante ähneln den isolierten Blattprimordien





Microsurgery





***phan* mutantes Blatt**

In Arabidopsis gibt es 3 redundante Gene *PHABULOSA* (*PHB), REVOLUTA (REV) und PHAVOLUTA* (*PHV*), die eine *PHAN*-ähnliche Funktion erfüllen

Loss-of-function kanadi Mutanten haben radiale, adaxialisierte Blätter

- Die 3-fach Mutante *kanadi 1,2,3* hat radiale, adaxialisierte Blätter. *KANADI* Gene fördern demnach die abaxiale Zellidentität.

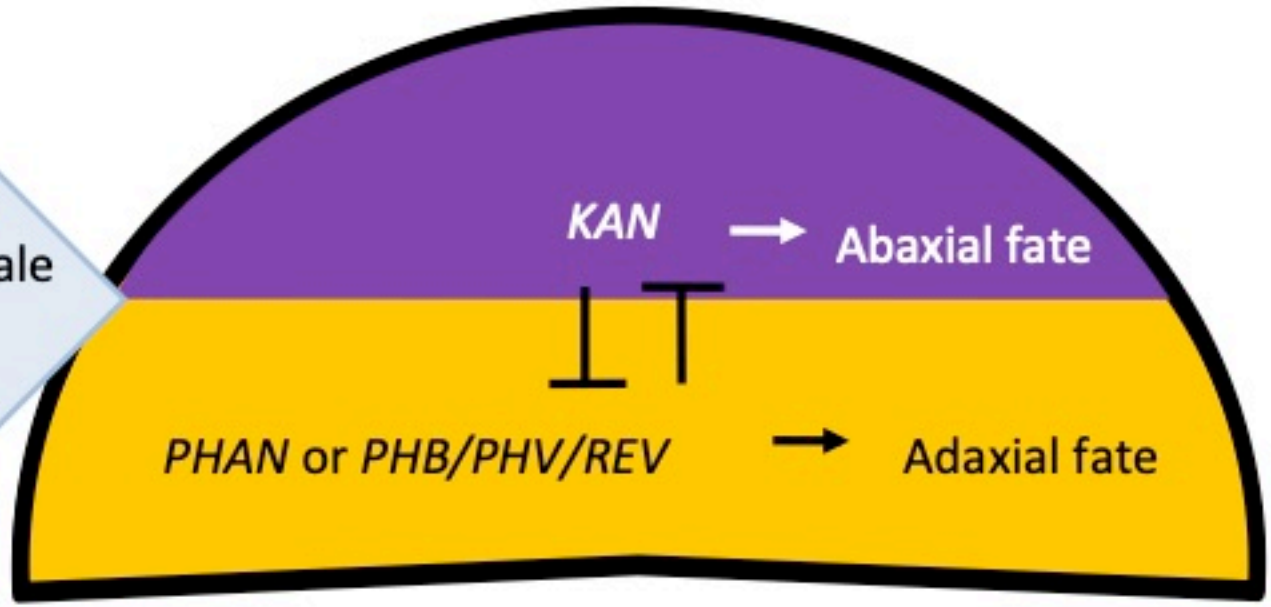
- ***KANADI*** und ***PHAN*** haben **gegensätzliche** Funktionen

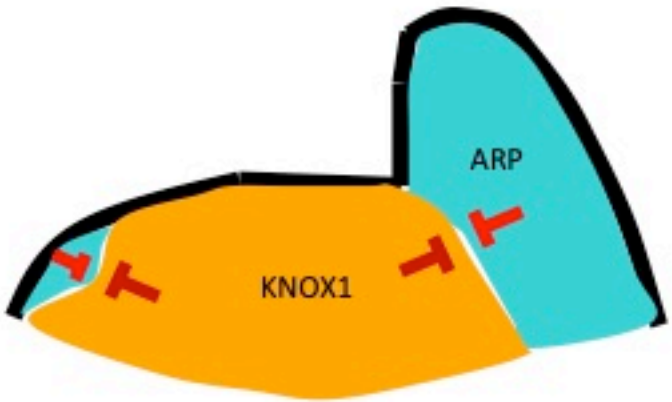
- *KANADI* Gene codieren ebenfalls Transkriptionsfaktoren (TFs)

Eshed Y et al., Izhaki, A., Baum, S.F., Floyd, S.K., and Bowman, J.L. (2004) Asymmetric leaf development and blade expansion in Arabidopsis are mediated by KANADI and YABBY activities. Development 131: 2997-3006.

Blattpolarität wird durch die kontrollierte Expression von TFs gewährleistet

Durch **gegenseitige Repession** bestimmter Gene wird die abaxiale und adaxiale Seite des Blattes spezifiziert





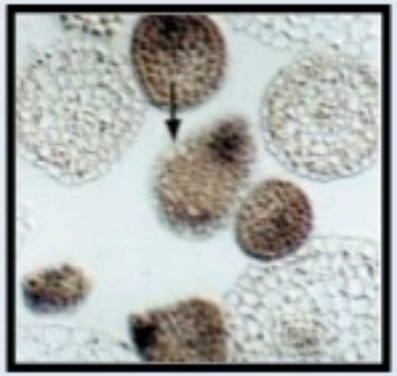
Gegenseitige Repression ist ein effektiver Weg, um benachbarten Zellen **unterschiedliche Identitäten** zu geben (➔VL2)

Eine erstaunliche Beobachtung...

PHABULOSA (PHB) ist für die Ausbildung der **ad**axialen Blattseite erforderlich.

PHB mRNA

In WT-Pflanzen akkumliert die *PHB* mRNA auf der **ad**axialen Seite des Primordiums.

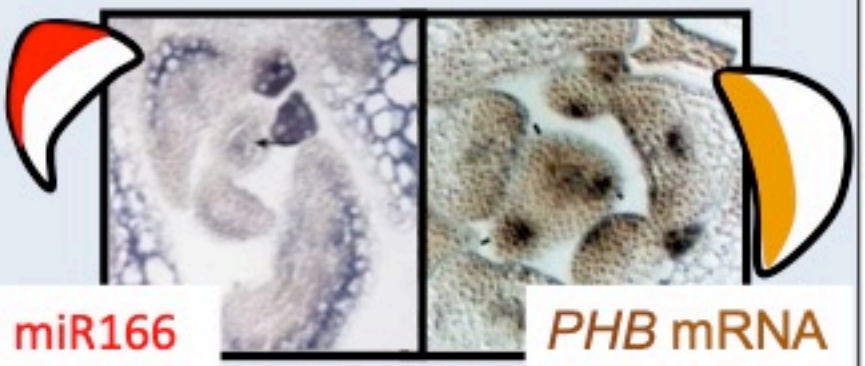


PHB-1D mRNA

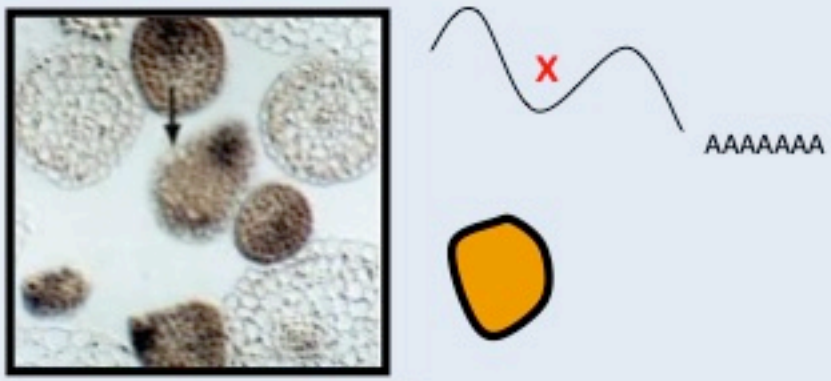
***phb-1d* Mutatenpflanzen zeigen adaxialisierte Blätter.**

Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. Nature 428: 81-84, copyright 2004.; McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M.K. Nature 411: 709-713.

Spezifische Expressionsmuster können durch MircoRNAs (miRNAs) reguliert werden



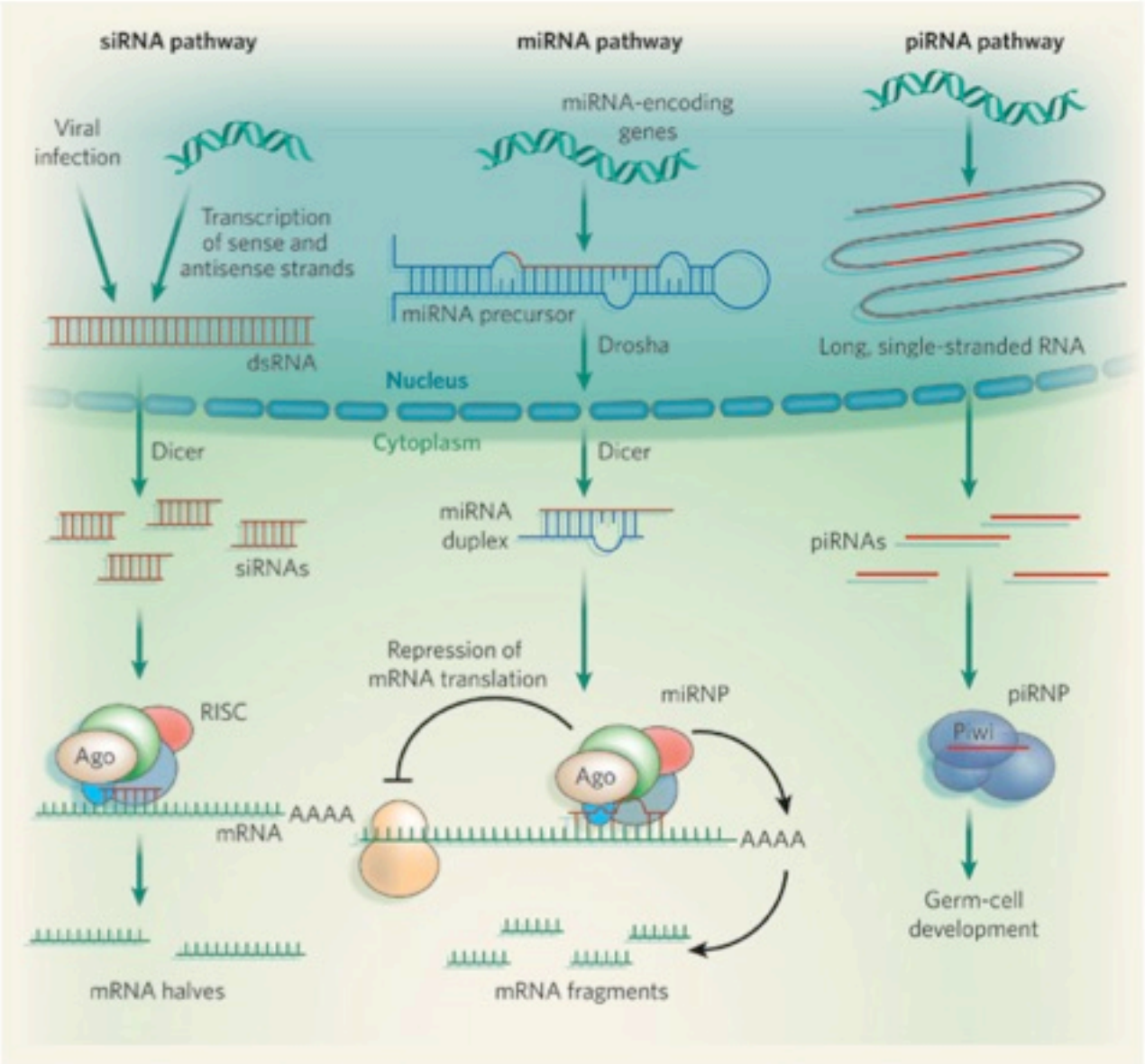
In WT-Pflanzen bindet miR166 an *PHB* mRNA und degradiert sie auf der abaxialen Seite des Blattprimordiums



In *phb-1d* Pflanzen verhindert ein Basenaustausch in der *PHB*-mRNA die Bindung von miR166, sodass sich die PHB-mRNA im gesamten Primordium verteilt.

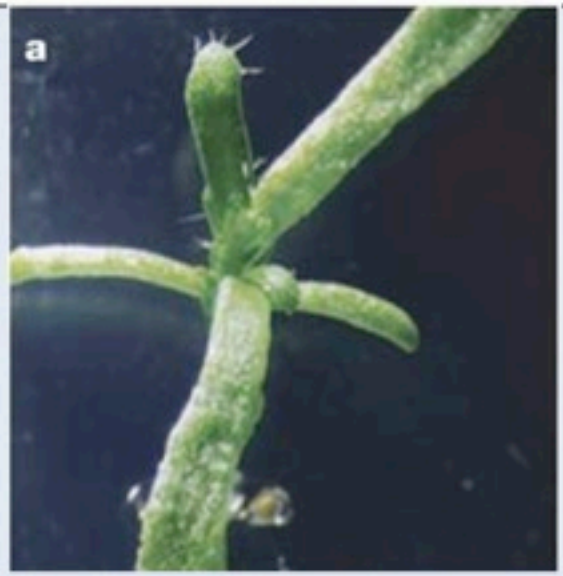
Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. Nature 428: 81-84, copyright 2004.; McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M.K. Nature 411: 709-713.

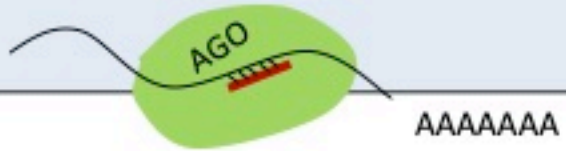
Exkursion: Kleine RNAs



miRNAs kontrollieren Blattpolarität

Die Tatsache, dass die *ago1*-Mutante radiale Blätter aufweist, unterstützt die Annahme, dass miRNAs eine Rolle bei der Blattpolarität spielen. AGO wird für die miR166 Funktion benötigt .

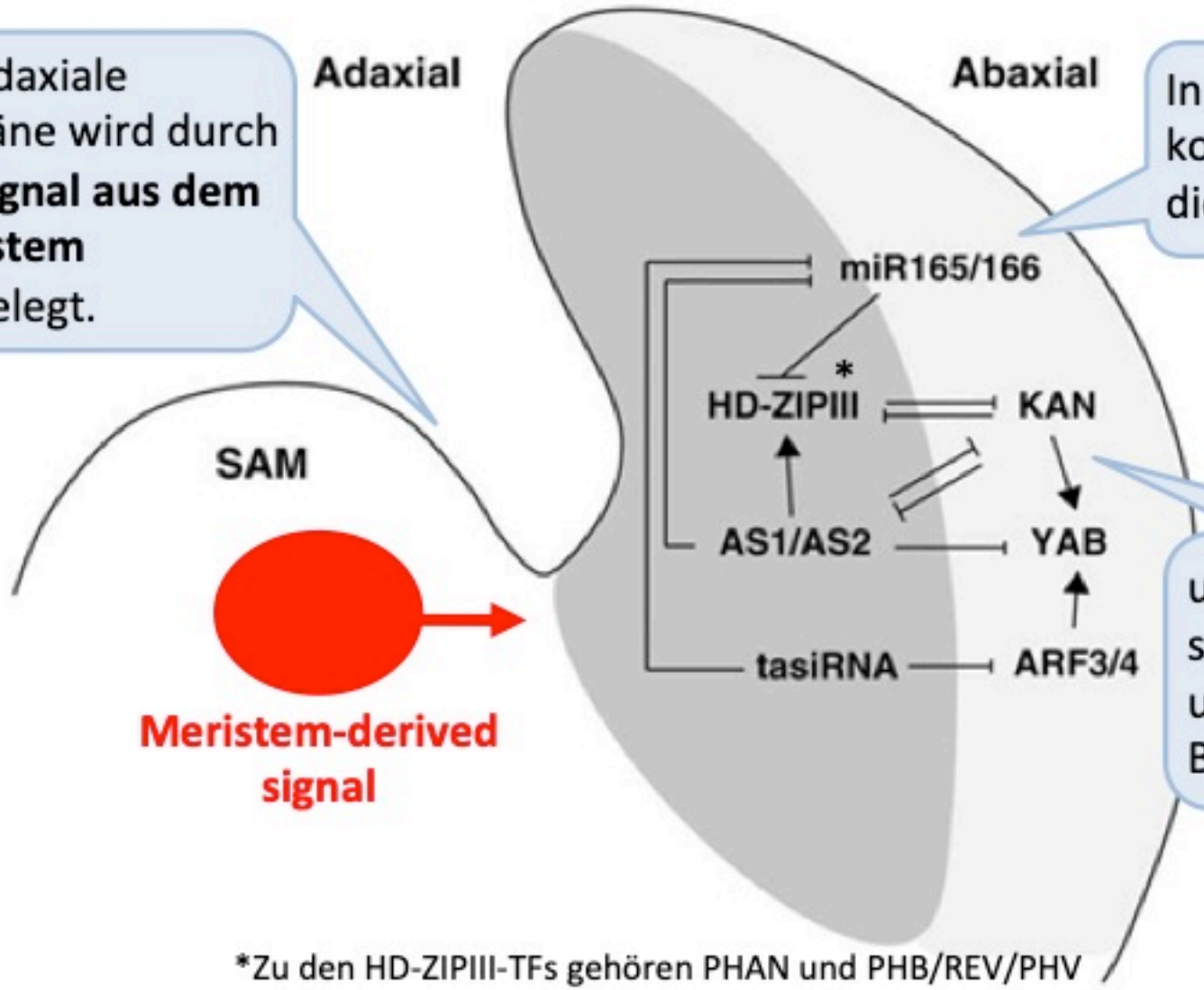




Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. Nature 428: 81-84, copyright 2004; McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M.K. Nature 411: 709-713.

Zusammenfassung III – Etablierung der Blattpolarität

Die adaxiale Domäne wird durch ein **Signal aus dem Meristem** festgelegt.



In einigen Fällen kontrollieren miRNAs die Expressionsmuster

unterschiedliche TFs spezifizieren die adaxiale und die abaxiale Blattseite

*Zu den HD-ZIPIII-TFs gehören PHAN und PHB/REV/PHV

Moon, J. and Hake, S. (2011) How a leaf gets its shape. Curr. Opin. Plant Biol. 14: 24–30.

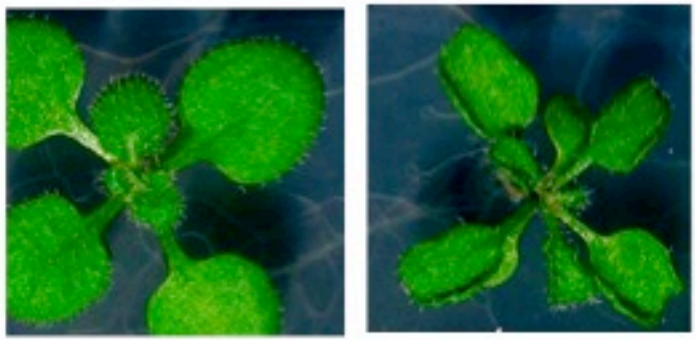
Muss das Blatt nur “oben” und “unten” definieren?

Verlust der WOX –Funktion bewirkt in verschiedenen Spezies schmale Blätter

Medicago

stenifolia (*wox1*) Mutante

Arabidopsis



wox1 wox3 Doppelmutante

Maize

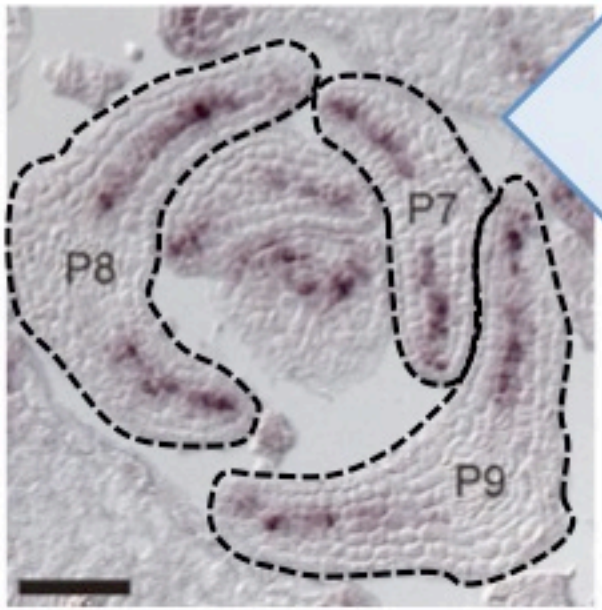
narrowsheath1
narrowsheath2
(*wox3*) Mutante

Petunia

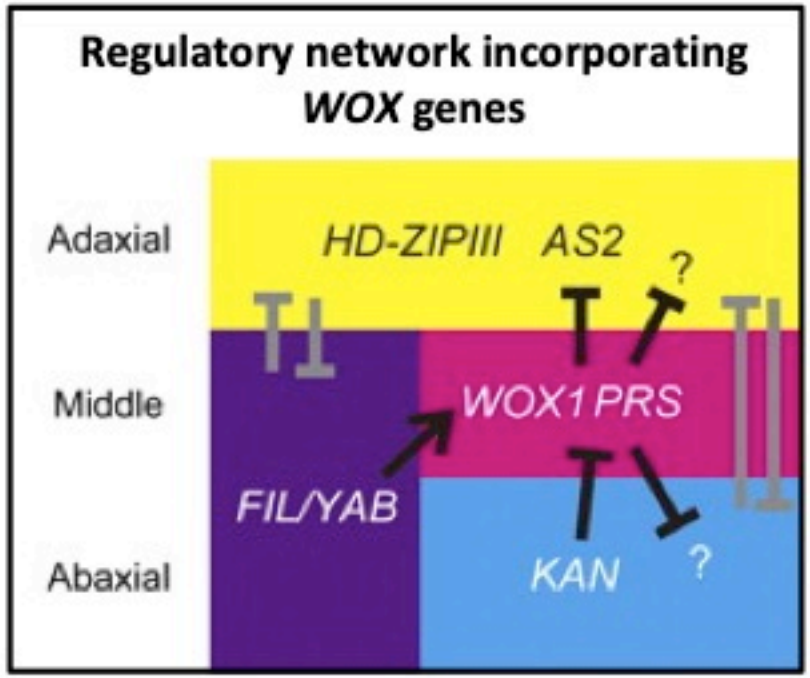
maw (*wox1*) Mutante

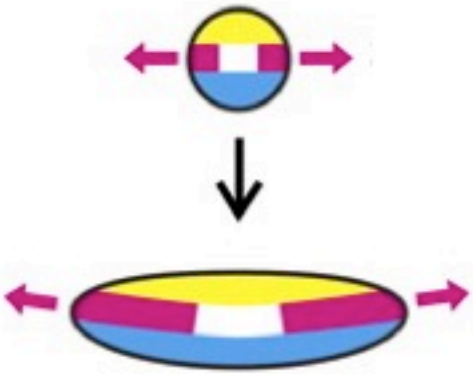
Nardmann, J., Ji, J., Werr, W. and Scanlon, M.J. (2004) The maize duplicate genes *narrow sheath1 and narrow sheath2* encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. Development 131: 2827-2839; Tadege, M., Lin, H., Bedair, M., Berbel, A., Wen, J., Rojas, C.M., Niu, L., Tang, Y., Sumner, L., Ratet, P., McHale, N.A., Madueño, F., Mysore, K.S. (2011) *STENOFOLIA* regulates blade outgrowth and leaf vascular patterning in *Medicago truncatula* and *Nicotiana sylvestris*. Plant Cell 23: 2125–2142; Vandenbussche, M., Horstman, A., Zethof, J., Koes, R., Rijpkema, A.S. and Gerats, T. (2009) Differential recruitment of WOX transcription factors for lateral development and organ fusion in Petunia and *Arabidopsis*. Plant Cell 21: 2269–2283.

Eine distinkte“Mitteldomäne” ist für das Auswachsen der Blattspreite wichtig



WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX (*WOX*) Gene sind in der Mitteldomäne exprimiert

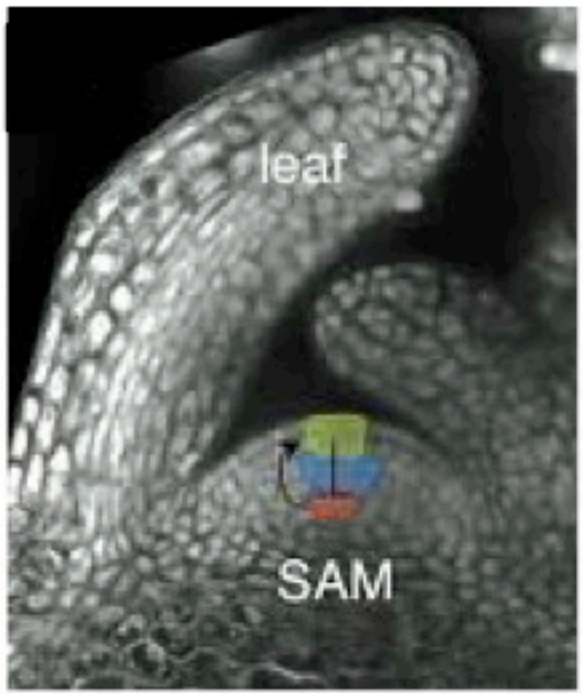


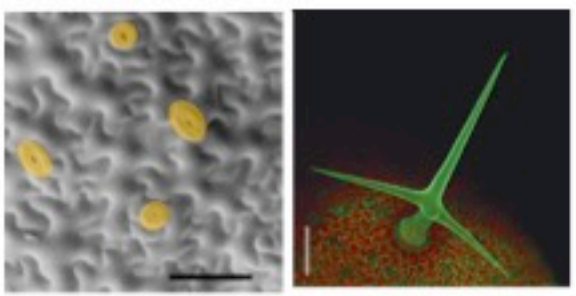


WOX -Expression in der Mitteldomäne (pink) ist essentiell für das Blattspreitenwachstum

Nakata, M., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Rikirsch, E., Laux, T. and Okada, K. (2012) Roles of the middle domain-specific *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX* genes in early development of leaves in *Arabidopsis*. Plant Cell 24: 519–535.

Konzepte der Vorlesung Blattentwicklung

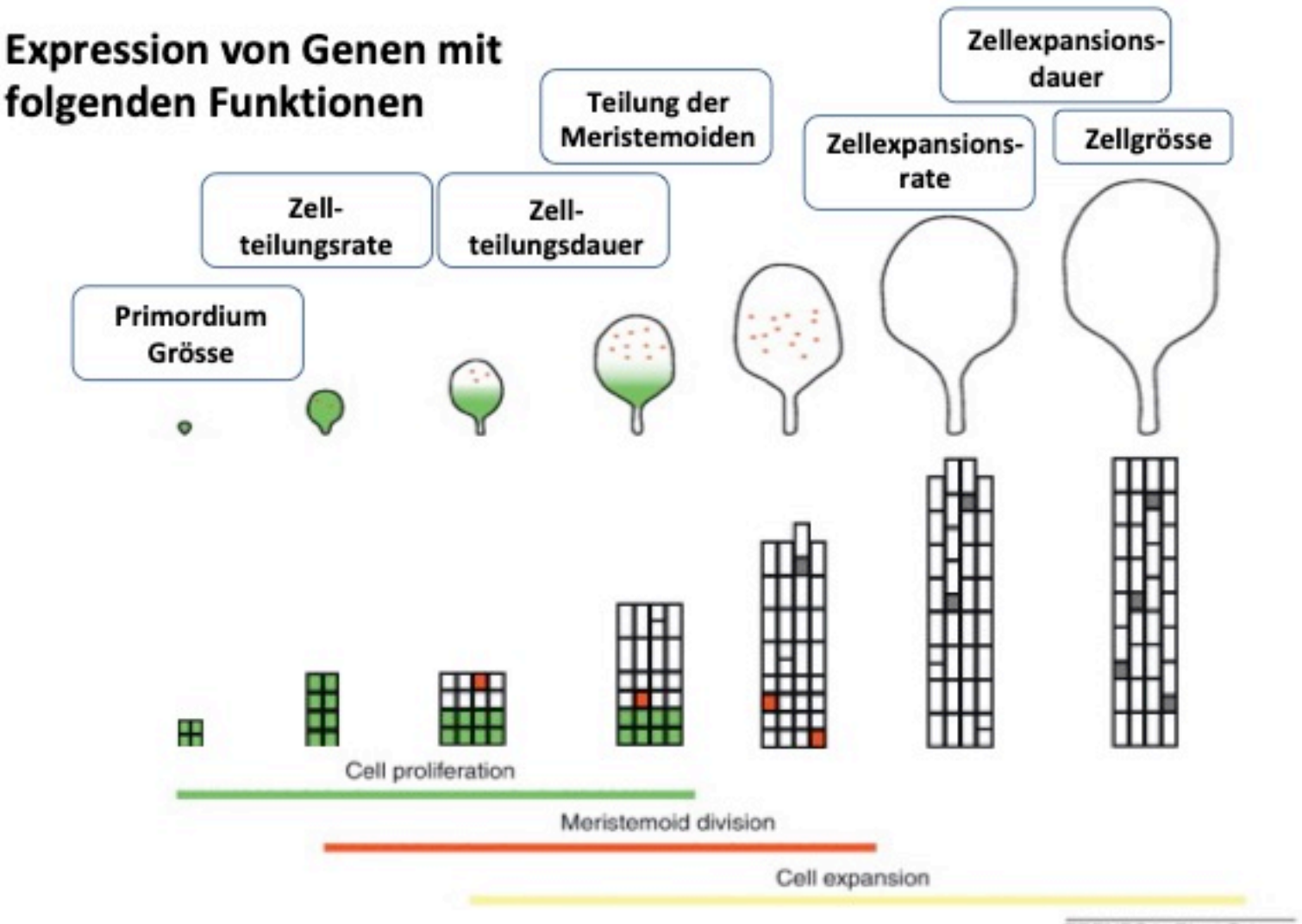




- ☞ Wie entsteht eine Blattanlage?
- ☞ Wie entstehen zusammengesetzte Blätter?
- ☞ Wie entsteht Blatt-Polatiät?
- ☞ **Blattwachstum und Form**
  - Mais
  - Arabidopsis

Wachstum umfasst Zellproliferation und Zellexpansion

Anfängliches Wachstum ist durch Proliferation im gesamten Primordium gekennzeichet, später ist die Zellteilung hingegen auf die Meristemoide beschränkt. Es folgt eine Phase der Zellexpansion, die teilweise mit der Zellteilung überlappt.

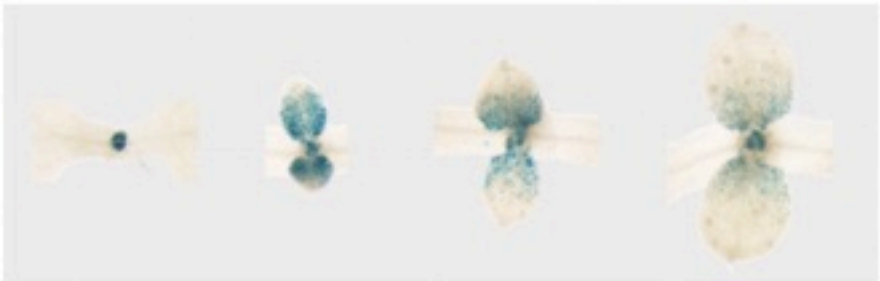


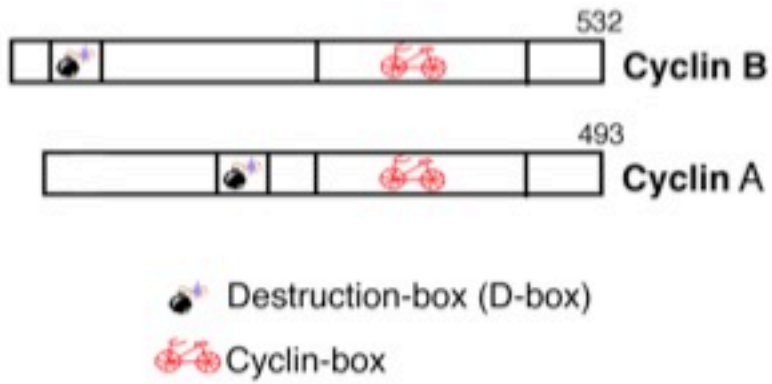
Gonzalez, N., Vanhaeren, H. and Inzé, D. (2012) Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. Trends Plant Sci. 17: 332–340.

Messen der Zellteilungsaktivität

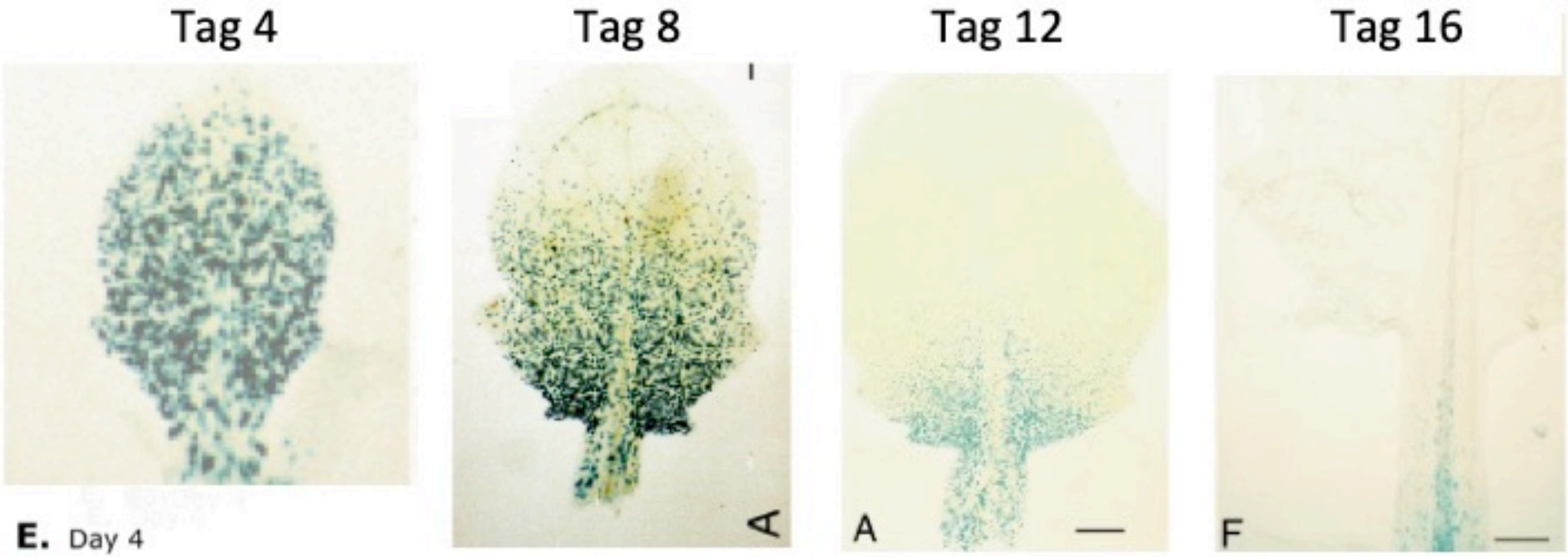
Problem: Markerproteine sind meist sehr stabil,
z.B. GUS hat eine Lebenszeit von über 2 Tagen!

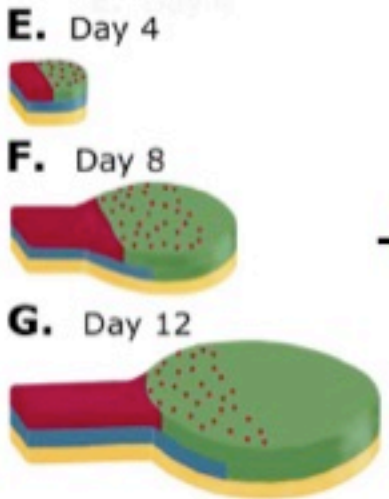
➔ Lösung: Markerprotein destabilisieren!





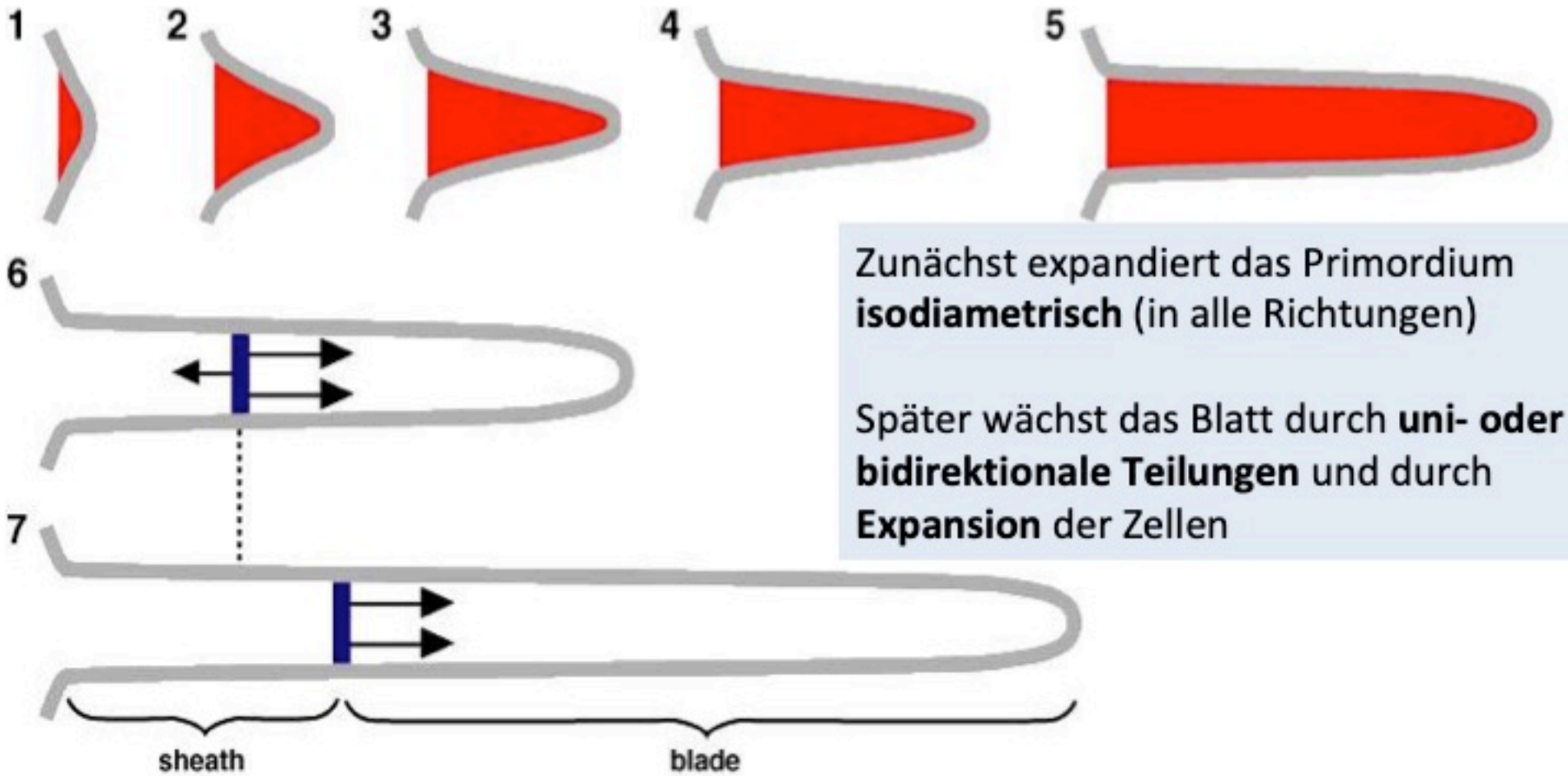
Zellteilungsaktivität während der Blattentwicklung





Donelly et al Dev Biol 1999

Wachstumsmuster können weitestgehend linear sein, wie bei Maisblättern

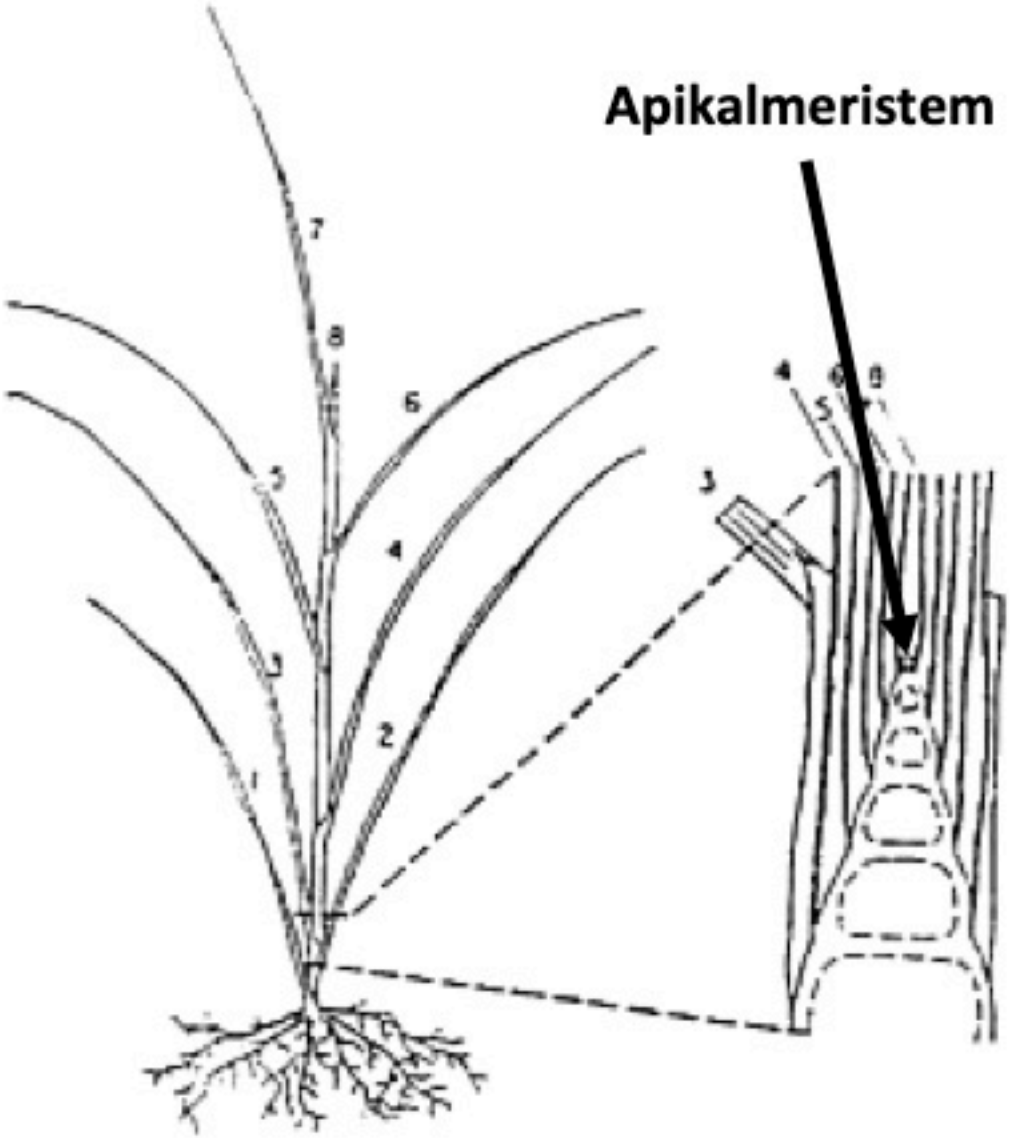


Zunächst expandiert das Primordium **isodiametrisch** (in alle Richtungen)

Später wächst das Blatt durch **uni- oder bidirektionale Teilungen** und durch **Expansion** der Zellen

Derksen, J. Hiddink and E.S. Pierson Copyright Radboud University Nijmegen

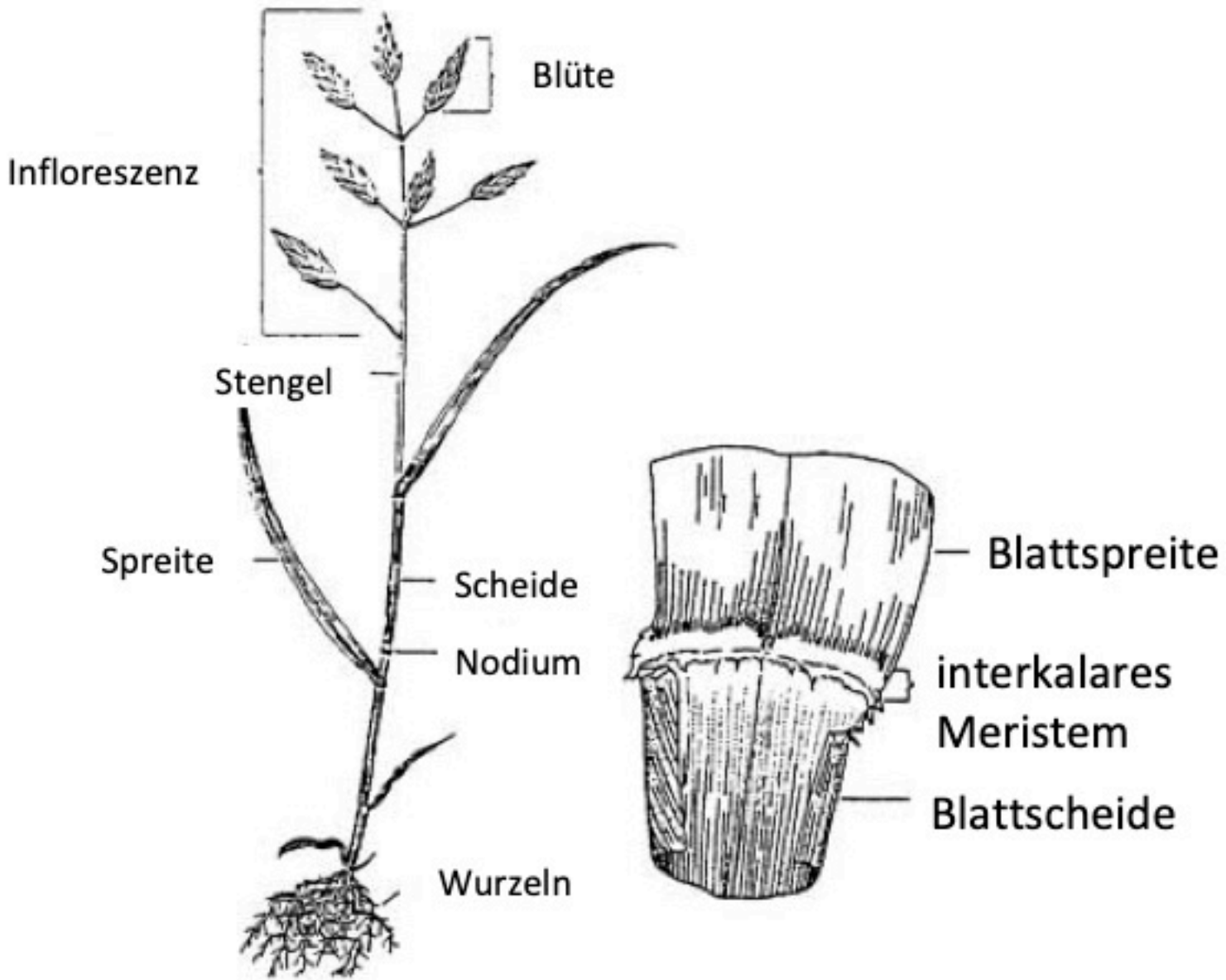
Blattentwicklung bei Gräsern
- Das Apikalmeristem -



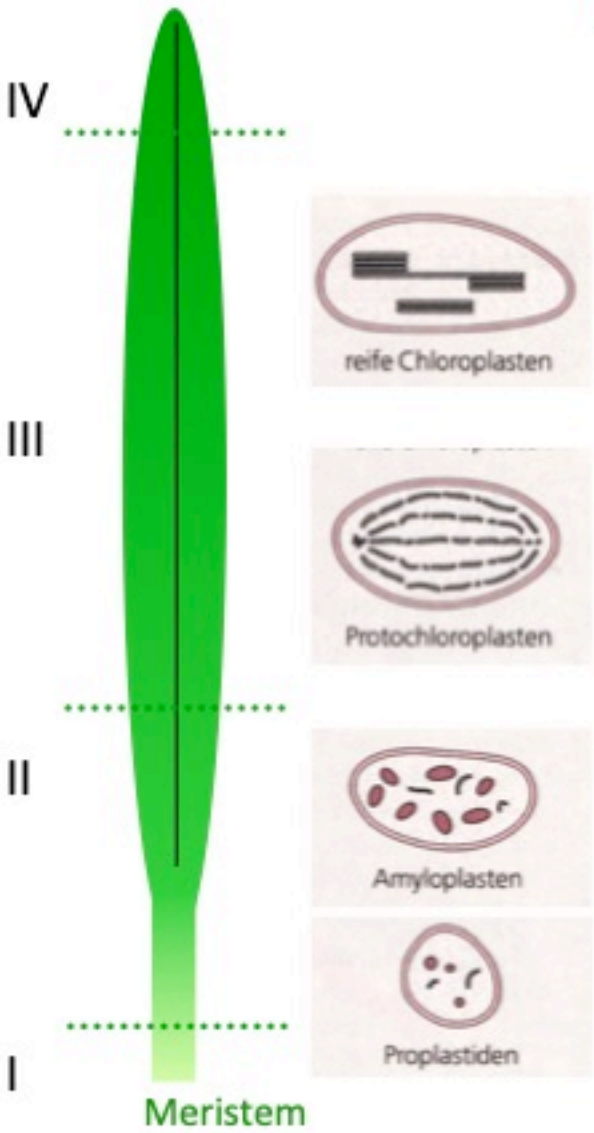
http://www.ext.colostate.edu/pubs/natres/NATRIMG/dm005cos.jpg

http://forages.oregonstate.edu/projects/regrowth/primordium.JPG

Blattentwicklung bei Gräsern
- Interkalare Meristeme in Blättern -

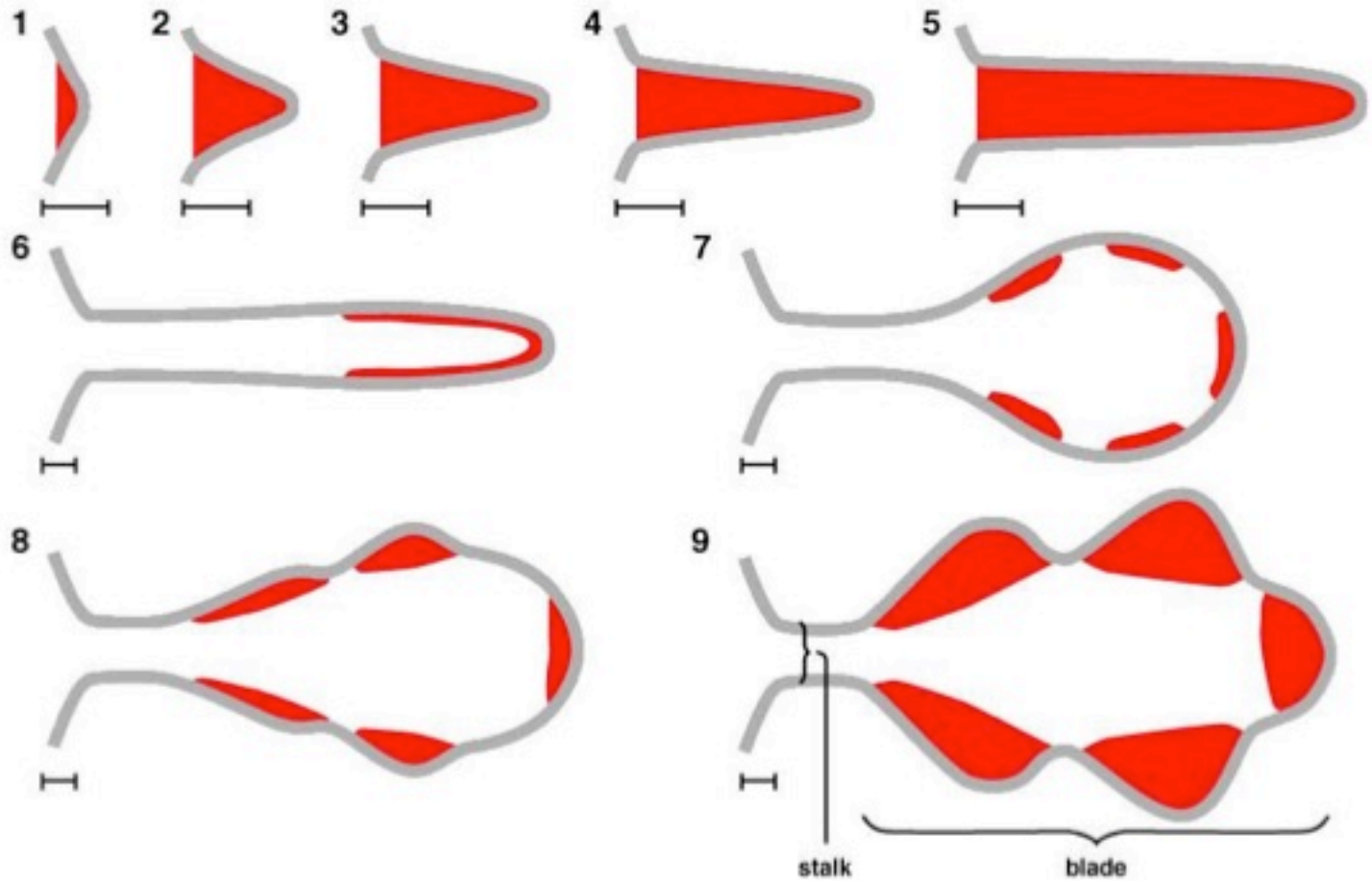


Entwicklungsgradient im Gramineenblatt



Blattentwicklung	Chloroplasten-entwicklung	Expressionsraten der Photosynthesegene
Zelltod	Seneszenz	sehr niedrig
Homöostase	Erhaltungsphase	hoch → niedrig
Zellvergrößerung	Aufbauphase	niedrig → hoch
Zellteilung und Festlegung der Identität	Initiierung	sehr niedrig

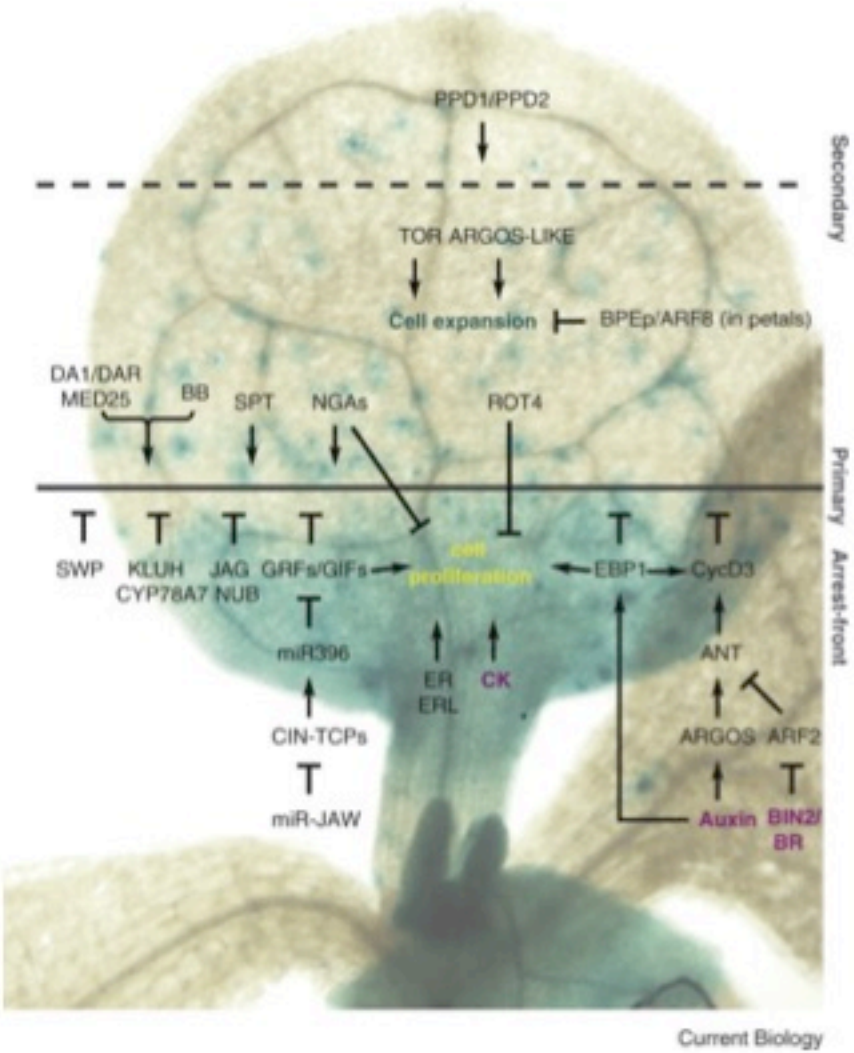
Wachstum in anderen Blättern ist komplexer..

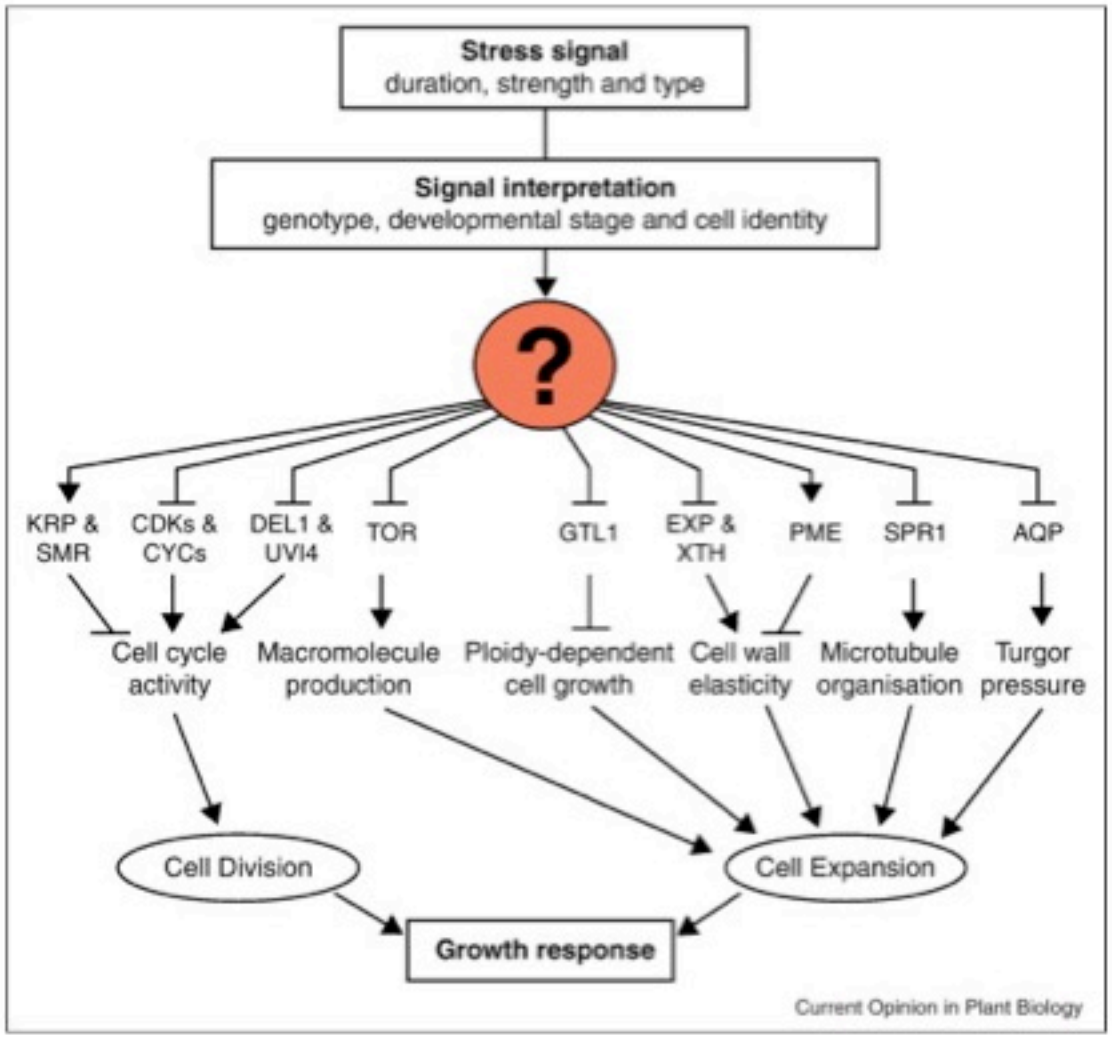


In breiteren Blättern tragen Zellteilungen nicht nur zur Länge, sondern auch zur zur Breite der Blattspreite bei. Komplexe Blattformen entstehen durch anhaltende Teilungen in isolierten Blattbereichen.

Derksen, J. Hiddink and E.S. Pierson Copyright Radboud University Nijmegen

Blattwachstum wird durch viele endogene und exogene Faktoren beeinflusst



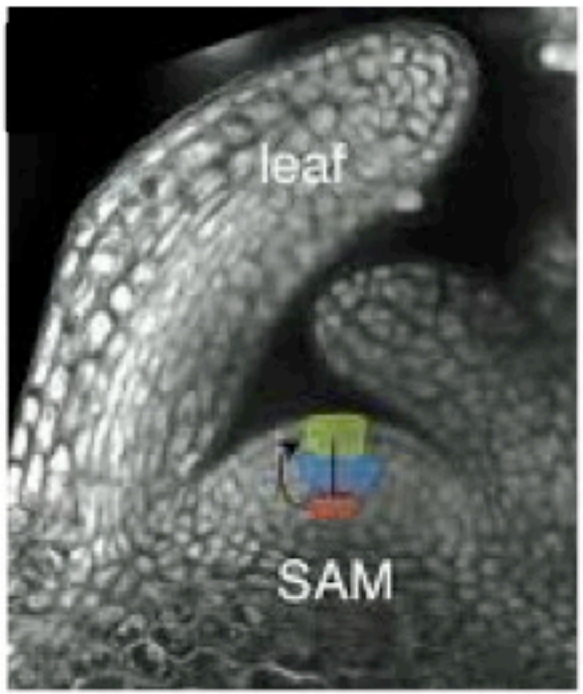


Powell, Anahid E. and Lenhard, M. (2012). Control of Organ Size in Plants. Curr. Biol. 22: R360-R367 and Rymen, B. and Sugimoto, K. (2012) Tuning growth to the environmental demands. Curr. Opin. Plant Biol. Andriankaja, M., Dhont, S., De Bodt, S., Vanhaeren, H., Coppens, F., De Milde, L., Mühlenbock, P., Skirycz, A., Gonzalez, N., Beamster, G.T.S. and Inzé, D. (2012) Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: A not-so-gradual process. Dev. Cell 22: 64–78.

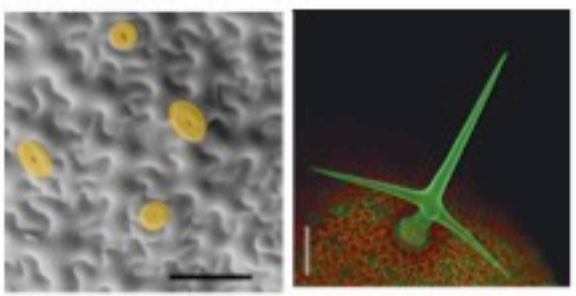
Zusammenfassung IV

- Blattwachstum erfolgt durch Phasen der Zellproliferation und Zellexpansion
- Bei Gräsern wird das Wachstum von Blättern und Stengeln wesentlich durch das Apikalmeristem und durch interkalare Meristeme vermittelt
- Das Blatt der Gräser zeigt einen Entwicklungsgradienten von der Blattbasis zur Blattspitze. Entsprechend erfolgt die Differenzierung der Plastiden entlang dieses Gradienten.
- In Blättern anderer Pflanzen sind die Zellteilungsmuster komplexer und tragen zur Breite und Komplexität der Blattspreite bei.
- Das Blattwachstum wird durch viele endogene Faktoren (Genotyp, Hormone,etc.) und exogne Faktoren (Umwelt-/Stressfaktoren) beeinflusst.

Konzepte der Vorlesung Blattentwicklung

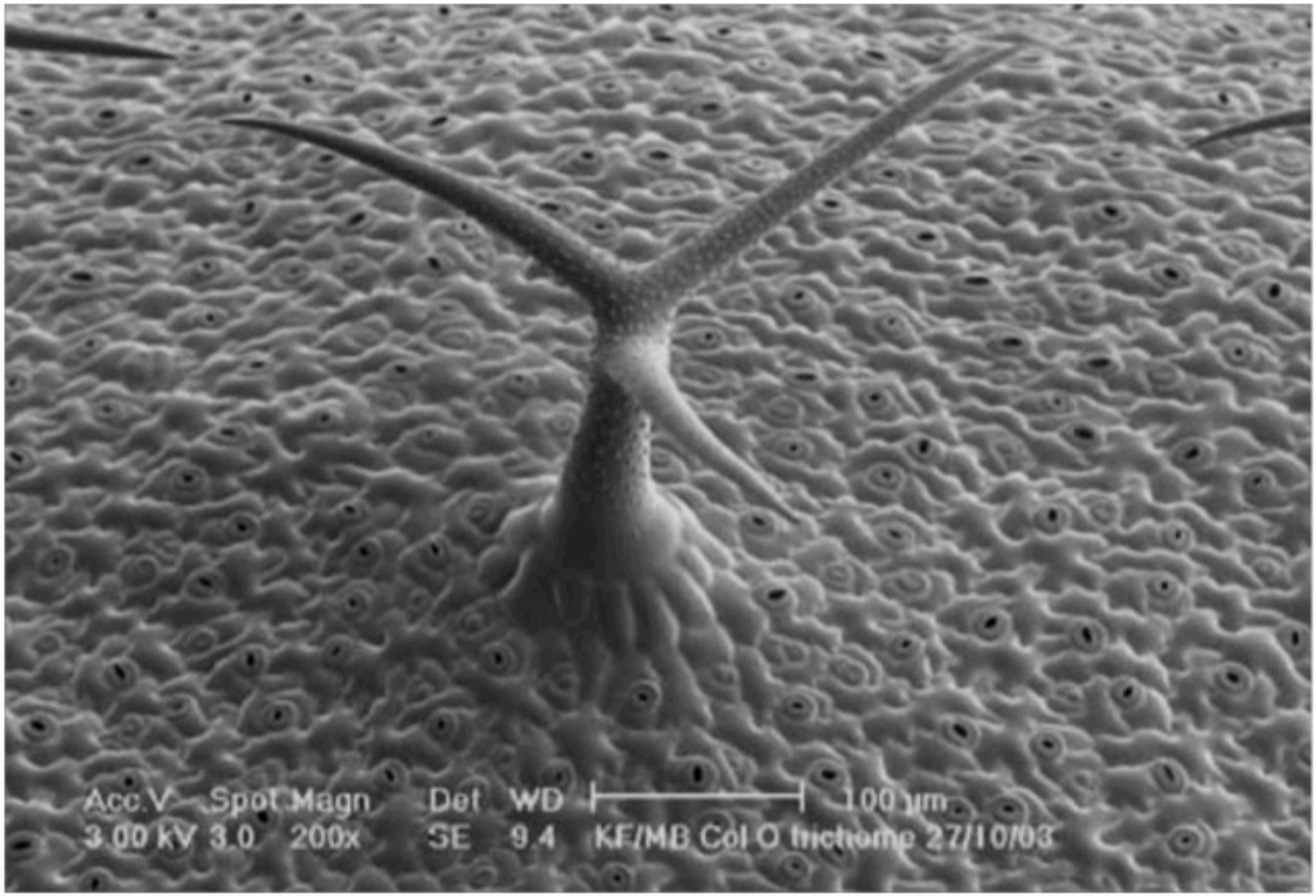


- ☞ Wie entsteht eine Blattanlage?
- ☞ Wie entstehen zusammengesetzte Blätter?
- ☞ Wie entsteht Blatt-Polatiät?
- ☞ Blattwachstum und Form
  - Mais
  - Arabidopsis

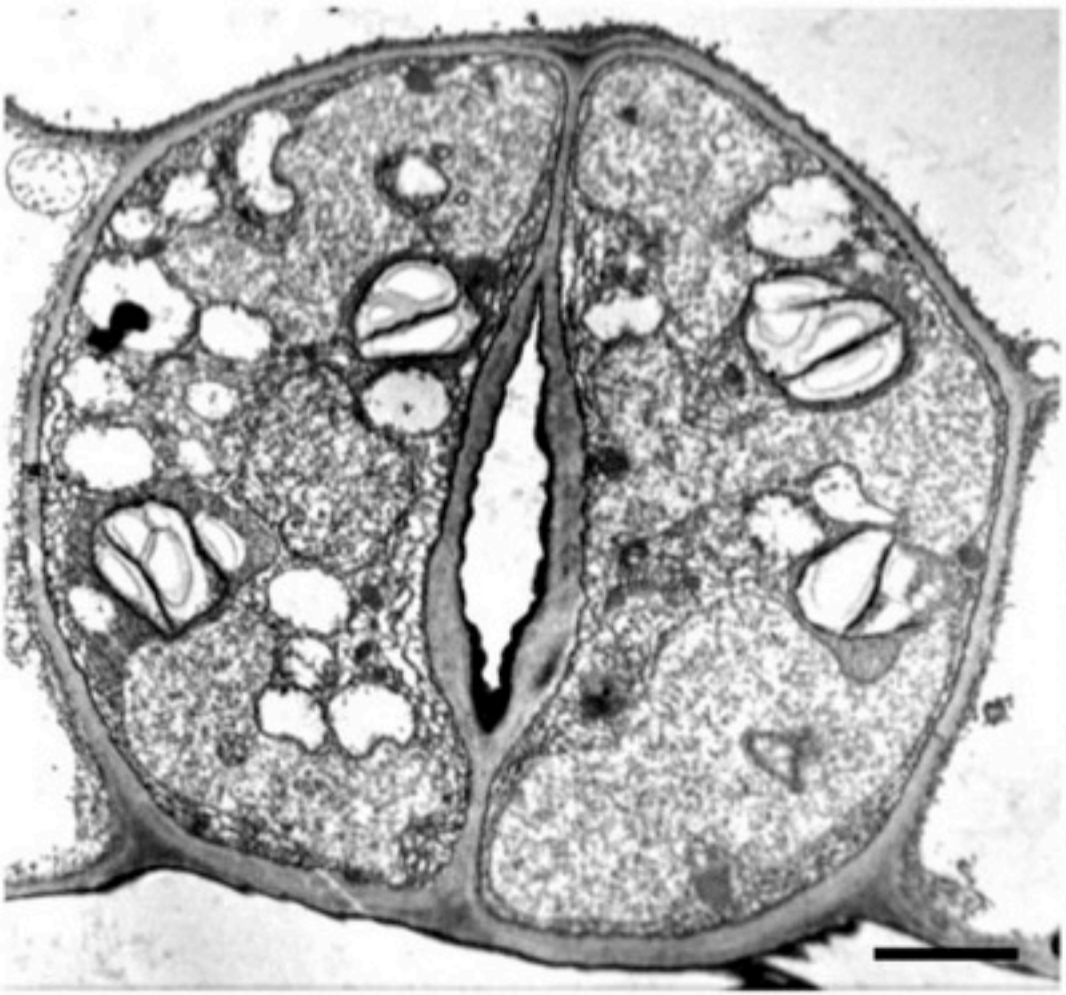


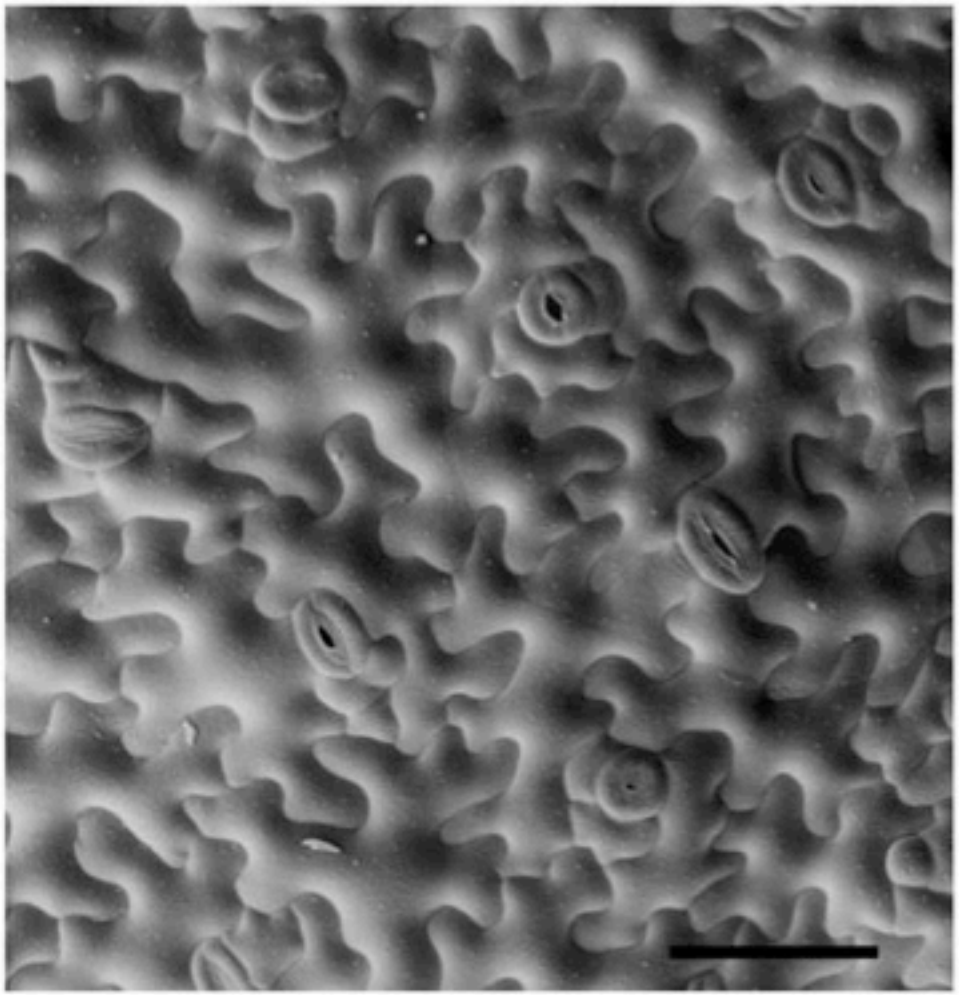
- ☞ **Differenzierungsprozesse**
  - Trichome
  - Stomata

4. Differenzierung der Blattoberfläche
Musterbildung und Zelldifferenzierung

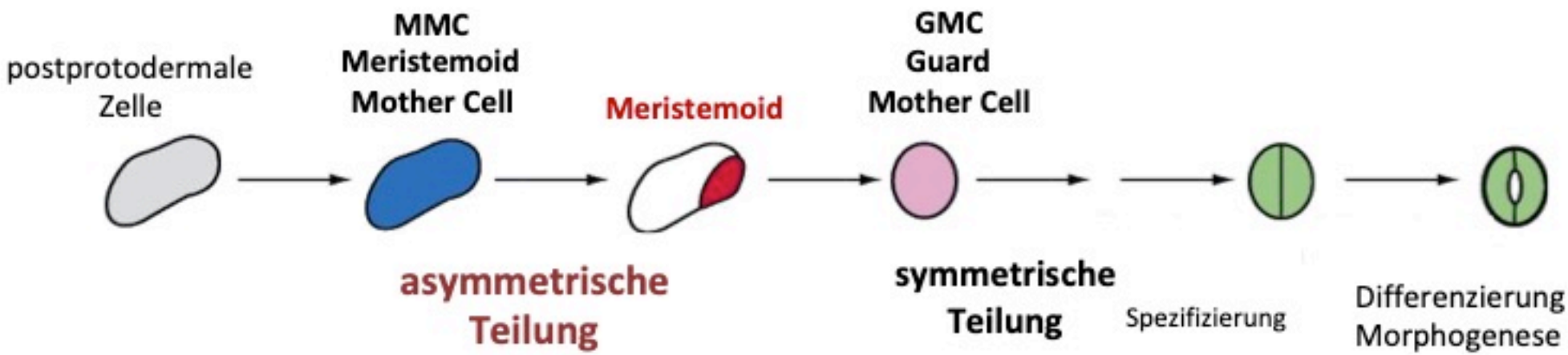


Stomata-Differenzierung

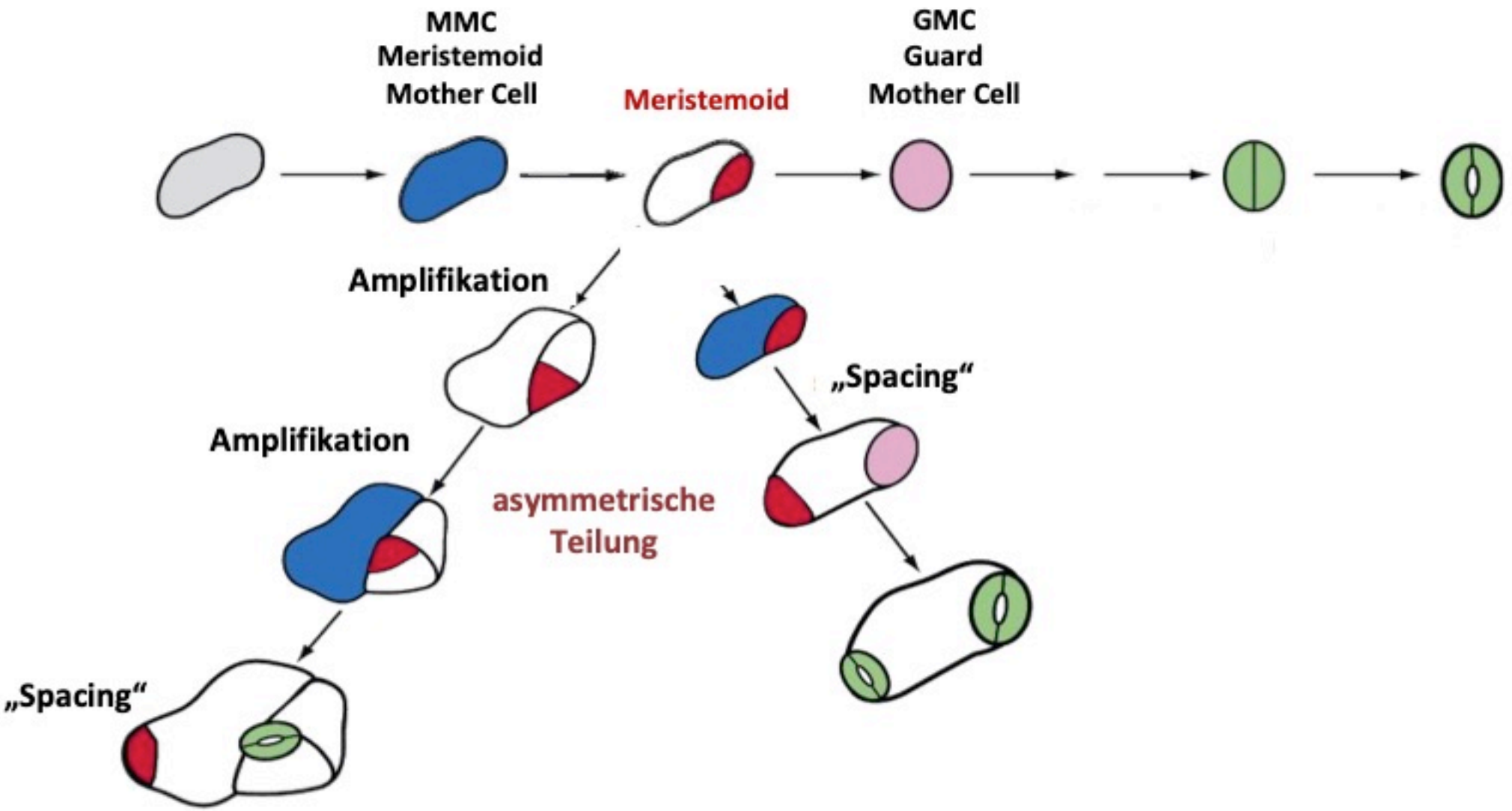




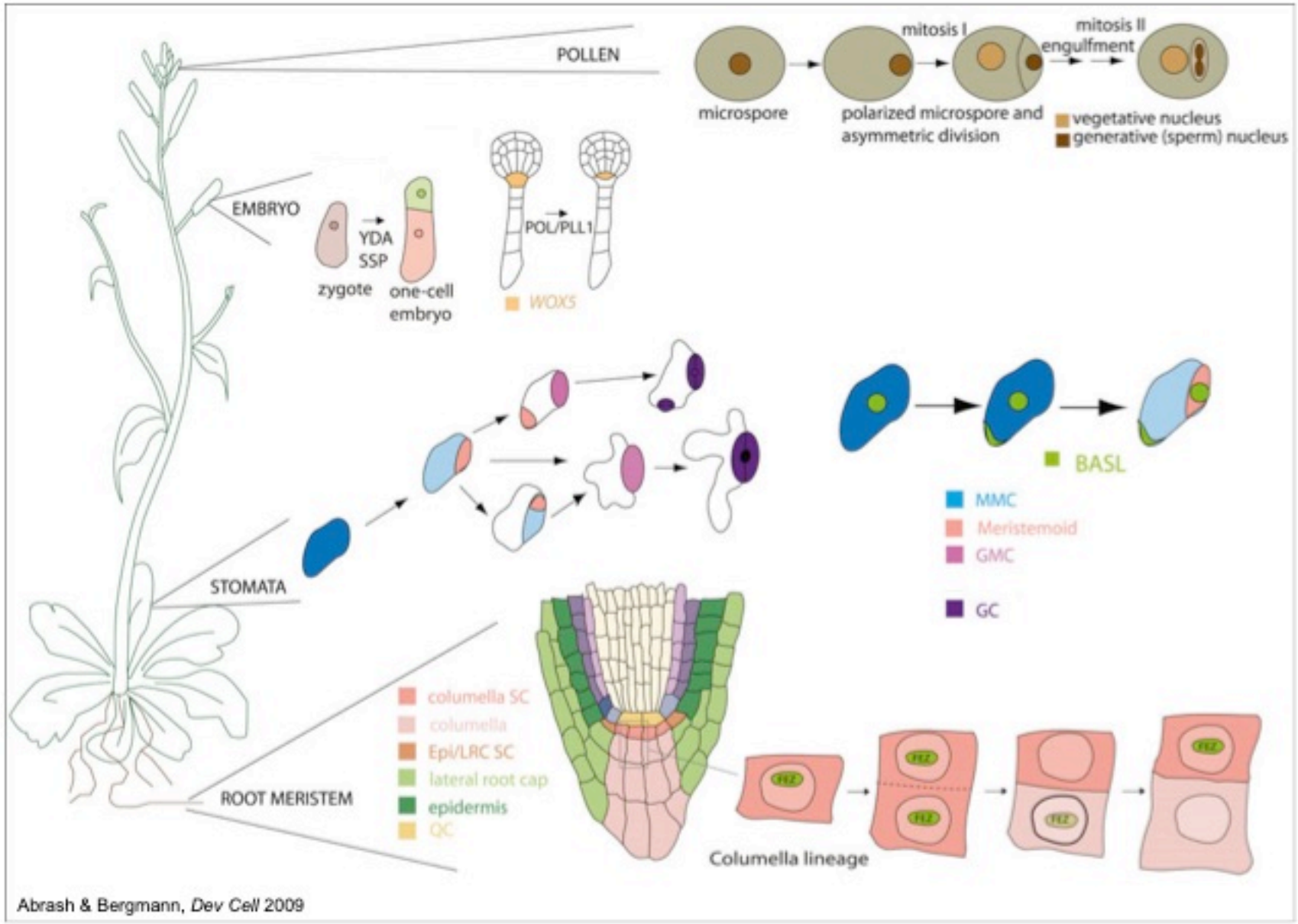
Bildung von Stomata – die MMC teilt sich asymmetrisch



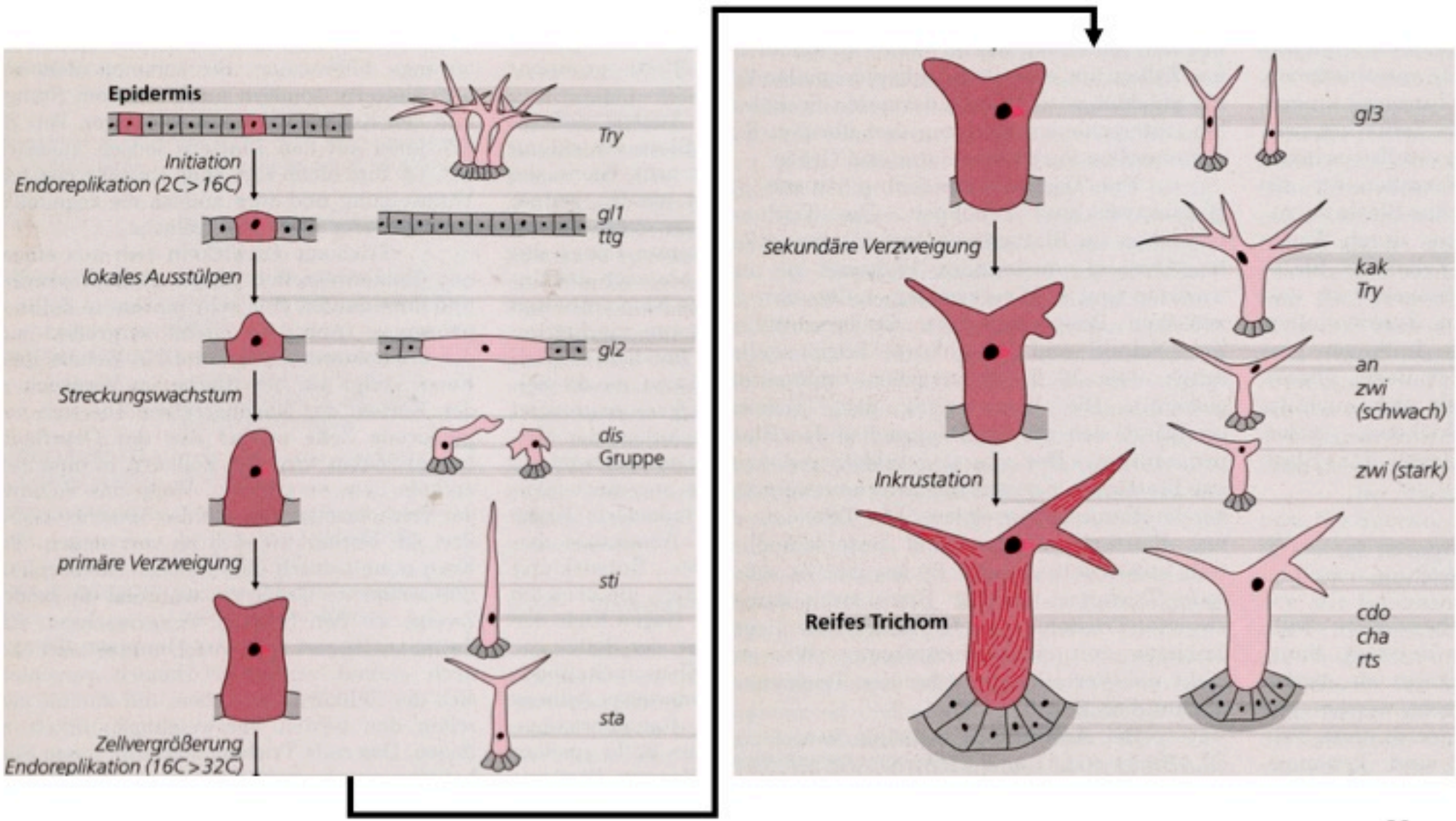
Meristemoide können mehrere amplifizierende asymmetrische Teilungen durchführen



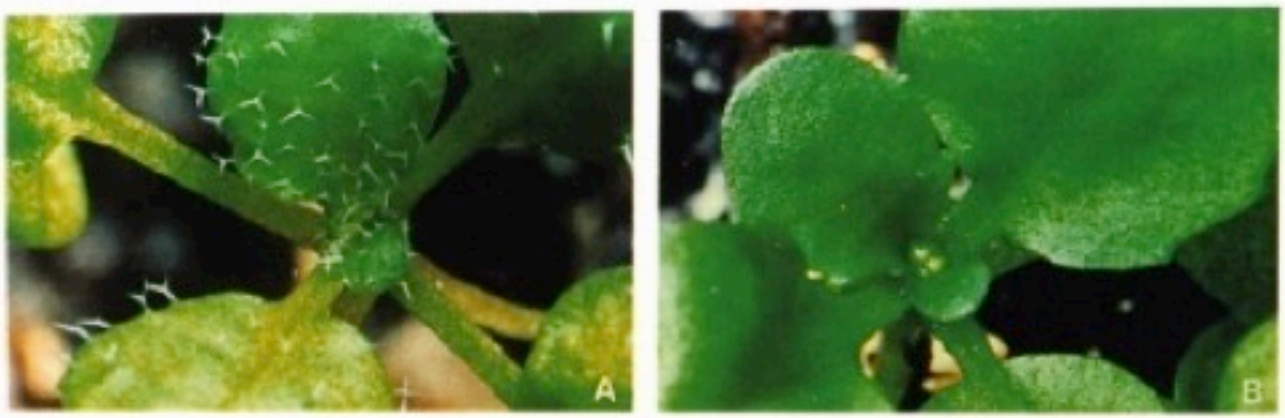
Asymmetrische Zellteilung sind zentrale Mechanismen verschiedener Entwicklungsprozesse



Differenzierung von Trichomen



Trichommusterbildungsmutanten



WT *gl1*

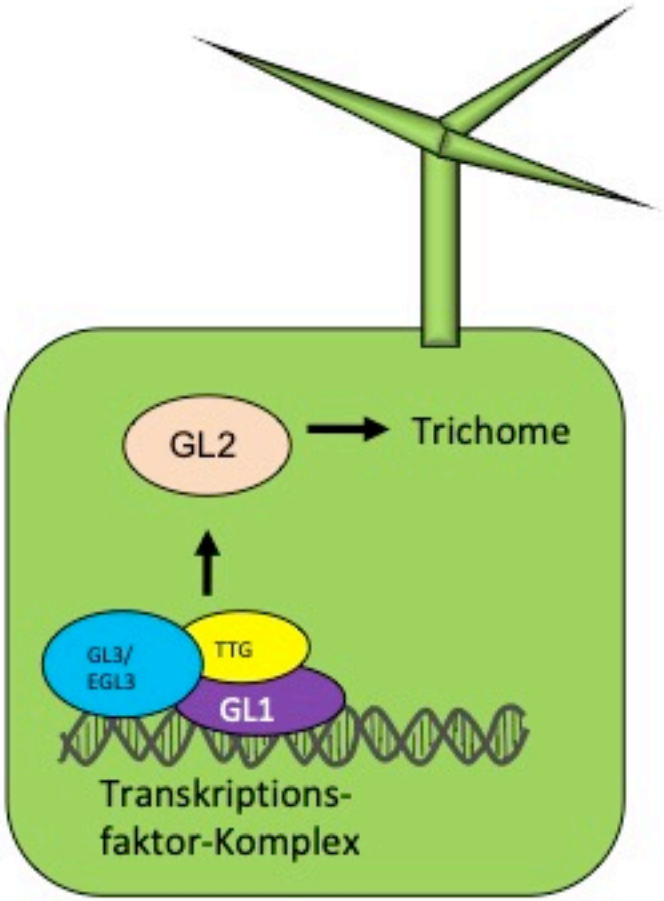
Einige Mutanten bilden weniger Trichome als der Wildtyp aus

Andere Mutanten produzieren (viel) mehr Trichome als der Wildtyp

Wild-type *cpc try* *cpc try etc3*

Hülskamp, M., Miséra, S., and Jürgens, G. (1994) Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. Cell 76: 555-566. Wester, K., Digiuni, S., Geier, F., Timmer, J., Fleck, C., and Hülskamp, M. (2009) Functional diversity of R3 single-repeat genes in trichome development. Development 136:1487-1496.

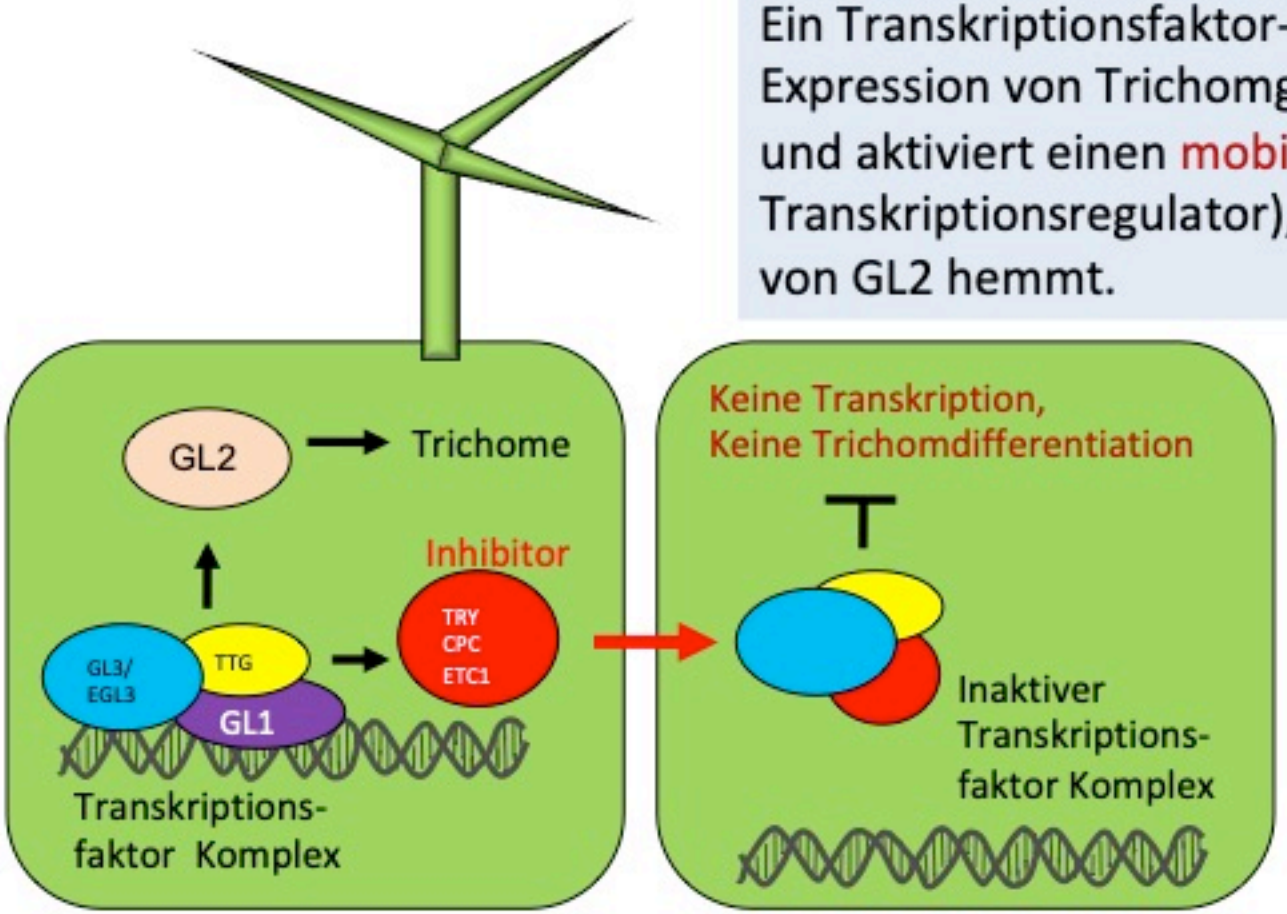
Die Trichommusterbildung in Arabidopsis kommt durch laterale Inhibition zu Stande



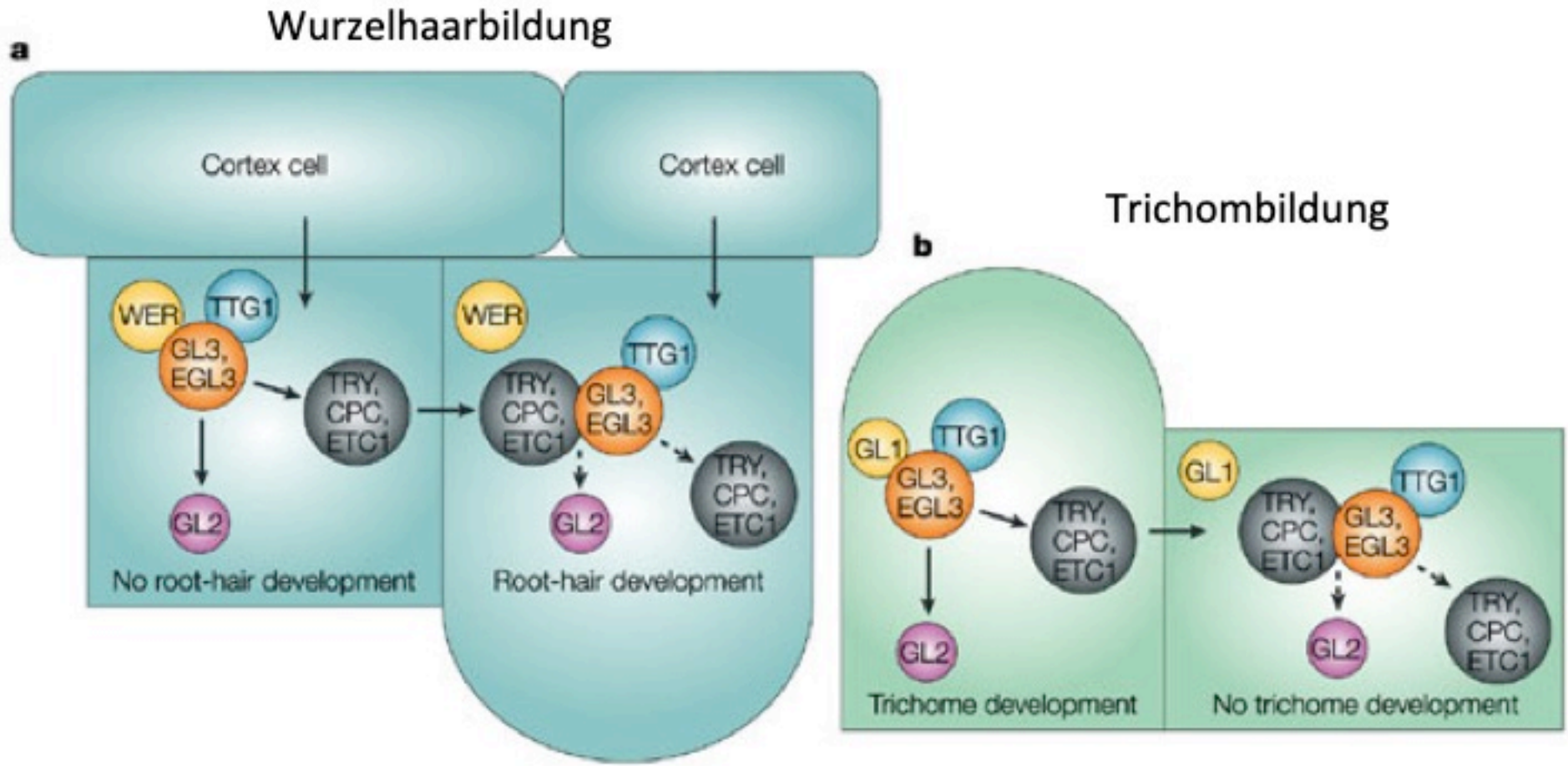
Ein Transkriptionsfaktor-Komplex aktiviert die Expression von Trichomgenen wie GLABRA2 (GL2).....

Die Trichommusterbildung in Arabidopsis kommt durch laterale Inhibition zu Stande

Ein Transkriptionsfaktor-Komplex aktiviert die Expression von Trichomgenen wie GLABRA2 (GL2)..... und aktiviert einen mobilen Inhibitor (auch Transkriptionsregulator), wo dieser die Expression von GL2 hemmt.



Gl2 und andere Gene sind Regulatoren sowohl der Wurzelhaar- als auch der Trichombildung



Viele Schlüsselgene steuern die Musterbildung unterschiedlicher Strukturen in ähnlicher Weise !

Hülskamp (2004) Nature Reviews Molecular Cell Biology 5

Zusammenfassung V

Die Musterbildung der Stomata basiert auf asymmetrischen (formativen) Zellteilungen. Asymmetrische Zellteilungen sind ein wichtiger Mechanismus bei vielen mehrzelligen Organismen, um Muster zu bilden.

Die Musterbildung bei der Trichombildung basiert auf einem lateralen Inhibitionsmechanismus – *jede Zelle will Trichom werden*.

Die Musterbildung bei der Trichom- und Wurzelhaarbildung (VL3) unterliegt vergleichbaren Regulationsmechanismen (Entwicklungsmodule)

Ende Vorlesung Teil IV